

Aus dem Zentrum für Neuropathologie und Prionforschung
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. Jochen Herms

**Untersuchungen zu epigenetischen Modifikationen
in neuronalen und glialen Zellen
bei Schizophrenie**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Zahnmedizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Judith-Yvonne Spanner

aus
München

2019

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. Armin Giese
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. Johanna C. Scheuermann PD Dr. Siegfried Kösel
Dekan:	Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel
Tag der mündlichen Prüfung:	15.04.2019

Eidesstattliche Versicherung

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Altfraunhofen, den 18.04.2019

Judith-Yvonne Spanner

Zusammenfassung

Thema:

Schizophrenie ist eine schwere, komplexe neuropsychiatrische Erkrankung, von der weltweit circa 1 % der Bevölkerung betroffen ist. Die Ätiologie der Erkrankung scheint multifaktorieller Natur zu sein: Mit einem Anteil von etwa 80 % bezeugt die Erblichkeit eine starke genetische Komponente. Trotz vieler Studien ist aber nicht bekannt, welche genauen genetischen Veränderungen zu der hohen Erblichkeit führen. Darüber hinaus bestehen zahlreiche Assoziationen der Erkrankung mit Stress auslösenden Umweltfaktoren.

Das Zusammenspiel von Genetik und Umweltfaktoren könnte auf eine epigenetische Krankheitsursache hindeuten: Epigenetische Mechanismen wirken an der Genregulation mit und prägen so den Phänotyp auf der Grundlage des Genotyps. Epigenetik wirkt unter anderem in Form von Modifikationen an der DNA (z.B. DNA-Methylierungen) oder in Form von nicht-kodierenden RNAs (ncRNAs), die von genomischer DNA transkribiert werden. Epigenetische Veränderungen sind zeitlebens durch Umweltfaktoren beeinflussbar. Jede Zellpopulation entwickelt ein spezifisches, epigenetisches Profil.

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit numerischen und epigenetischen Veränderungen der neuronalen und glialen Zellkerne in den Brodmann-Arealen 10 und 17/18 bei Schizophrenie. Die Darstellung beginnt mit der im Kortexgewebe gemessenen Anzahl neuronaler und glialer Zellkerne. Darauf aufbauend befasst sich der zweite Teilbereich mit der DNA-Methylierung, die im zweiten GRE des Introns 7 im FKBP5-Gen untersucht wird. Das FKBP5-Protein ist in die Stressregulation involviert. Der Fokus des dritten Teilbereichs liegt auf der Expressionsanalyse von 90 nicht-kodierenden RNAs.

Methode:

Die Extraktion der neuronalen und glialen Zellkerne aus dem Hirngewebe erfolgte mittels Durchflusszytometrie unter Verwendung des neuronenspezifischen Antikörpers NeuN. Die DNA-Methylierung am FKBP5-Gen wurde anhand von Bisul-

fit-Konvertierung und Sanger-Sequenzierung untersucht. Bei der Expressionsanalyse von 90 ncRNAs kam die Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion zur Anwendung. Die Entwicklung einer Auswertungsstrategie der generierten Expressionsdaten stellte einen Schwerpunkt der Arbeit dar.

Ergebnisse und Schlussfolgerung:

Die vorliegende Arbeit zeigt keine veränderte Anzahl der neuronalen Zellkerne in den untersuchten Hirnarealen bei Schizophrenie. Die glialen Zellkerne hingegen sind in den untersuchten Arealen bei Schizophrenie vermindert. Dieser Befund ist jedoch statistisch nicht signifikant.

Nach den Ergebnissen dieser Arbeit wird die DNA-Methylierung am FKBP5-Gen in den neuronalen und glialen Zellkernen der untersuchten Hirnareale nicht von der Erkrankung Schizophrenie beeinflusst. Diese Aussage steht jedoch unter Vorbehalt, da die Ergebnisse einer genomweiten Untersuchung der DNA-Methylierung noch ausstehen.

Die Expressionsanalyse von 90 ncRNAs weist eine veränderte Expression von 14 ncRNAs bei Schizophrenie nach: In den neuronalen Zellkernen des Brodmann-Areals 10 sind Jpx, ST7OT und p53 mRNA bei Schizophrenie verstärkt exprimiert. In den neuronalen Zellkernen der Brodmann-Areale 17/18 sind LOC285194, RNCR3 und TEA ncRNAs bei Schizophrenie vermindert und Malat 1 verstärkt exprimiert. In den glialen Zellkernen des Brodmann-Areals 10 ist Har1B bei Schizophrenie vermindert exprimiert; in den glialen Zellkernen der Brodmann-Areale 17/18 sind IPW, Kncq1ot1, mascRNA und SNHG6 bei Schizophrenie vermindert und BACE1AS (family) und DHFR upstream transcripts (family) verstärkt exprimiert. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass es einen Zusammenhang zwischen der Erkrankung Schizophrenie und einer veränderten Expression bestimmter ncRNAs gibt. Für weiter reichende Schlussfolgerungen ist eine Replikation der Daten mit einem unabhängigen Studienkollektiv notwendig.

Abstract

Introduction

Schizophrenia is a serious and complex psychiatric disorder. Worldwide, about 1 % of the population is affected. The aetiology of schizophrenia seems to be multifactorial: Heritability is around 80 % and certifies a strong genetic component. Despite many studies, it remains unknown, which exact genetic variants cause the high heritability. Schizophrenia is also associated with a number of environmental and stress-inducing factors.

The interaction between genetic and environmental factors suggests epigenetic causes. Epigenetic modifications participate in gene-regulation. Thus, epigenetics shapes the organism's phenotype based on its genotype. Epigenetic mechanisms include modifications of the DNA (like DNA-methylation) and non-coding RNAs (ncRNAs), which are transcribed from genomic DNA. Epigenetic modifications are specific for different cell types and modifiable by environmental factors.

The present study examines specific epigenetic modifications in schizophrenia in neuronal and glial cell nuclei of Brodmann-areas 10 and 17/18. Firstly, the amount of cell nuclei was analysed. Secondly, DNA-methylation of a part of the FKBP5-gene was analysed – the second GRE of Intron 7. FKBP5-protein is involved in stress regulation. Finally, the expression of 90 ncRNAs in schizophrenia is investigated.

Method:

Neuronal and glial cell nuclei were isolated and separated from brain tissue by flow cytometry using the antibody NeuN that binds specifically to neuronal nuclei. Bisulfite conversion and Sanger sequencing were used to analyse DNA-methylation. NcRNAs expression was investigated by real-time-PCR. The development of an evaluation strategy for the ncRNA expression was a main focus of this study.

Results and conclusion:

The present study shows that the amount of neuronal cell nuclei in schizophrenia is not altered either in Brodmann area 10 or in Brodmann areas 17/18. The amount of glial cell nuclei is decreased in schizophrenia in both regions. However, the latter findings are not statistically significant.

The results of this study show that DNA-methylation of second GRE of intron 7 in the FKBP5-gene is not altered in schizophrenia neither in neuronal or glial cell nuclei in investigated brain regions. However, data from genome wide analysis of DNA-methylation are pending.

Fourteen of 90 analysed ncRNAs are expressed differently in schizophrenics compared to controls. In neuronal cell nuclei of Brodmann area 10 the expression of Jpx, ST7OT and p53 mRNA is increased in schizophrenia. In neuronal cell nuclei of Brodmann areas 17/18 the expression of LOC285194, RNCR3 and TEA ncRNAs is decreased in schizophrenia and the expression of Malat1 is increased. In glial cell nuclei of Brodmann area 10 Har1B is decreased expressed in schizophrenia; in glial cell nuclei of Brodmann areas 17/18 the expression of IPW, Kncq1ot1, mascRNA and SNHG6 is decreased in schizophrenia and the expression of BACE1AS (family) and DHFR upstream transcripts (family) is increased. However, independent data replication with a different sample set is necessary to further confirm the observed relation between altered ncRNA-expression and schizophrenia.

Inhaltsverzeichnis

1	<i>Einleitung</i>	1
1.1	Schizophrenie	2
1.1.1	Krankheitsbild und Therapie	2
1.1.2	Pathologie	4
1.1.2.1	Makroskopische Veränderungen im Gehirn schizophrener Probanden	4
1.1.2.2	Mikroskopische Veränderungen im Gehirn schizophrener Probanden	4
1.1.2.3	Veränderungen in den Brodmann-Arealen 10 und 17/18 bei Schizophrenie	7
1.1.2.4	Mögliche Zusammenhänge zwischen Pathologie und Pathogenese	10
1.1.3	Ätiologie der Schizophrenie	11
1.1.3.1	Genetische Prädisposition	11
1.1.3.2	Umweltfaktoren	12
1.2	Epigenetik	14
1.2.1	DNA-Methylierung	16
1.2.2	DNA-Methylierung und Schizophrenie	17
1.2.3	Nicht-kodierende RNAs	19
1.2.4	LncRNAs	20
1.2.5	Nicht-kodierende RNAs und Schizophrenie	21
1.3	Fragestellung	22
2	<i>Material und Methoden</i>	24
2.1	Studienkollektiv und Probengewinnung	25
2.1.1	Studienkollektiv	25
2.1.2	Zielregion und Gewebegewinnung	28
2.1.3	Aufbau der Arbeit als Fall-Kontroll-Studie	28
2.2	Extraktion der neuronalen und glialen Zellkerne und Extraktion der DNA und RNA	30
2.2.1	Extraktion der neuronalen und glialen Zellkerne	30
2.2.1.1	Puffer	30
2.2.1.2	Zellkernextraktion aus dem Hirngewebe	31
2.2.1.3	Zelltypspezifische Auftrennung der isolierten Zellkerne	31
2.2.1.4	Normalisierung und statistische Auswertung der Zellkerne	34
2.2.2	DNA-Extraktion aus den neuronalen und glialen Zellkernen	34
2.2.3	RNA-Extraktion aus den neuronalen und glialen Zellkernen	35
2.2.4	DNA- und RNA-Konzentration	36

2.2.4.1 Messung der DNA- bzw. RNA-Konzentration	36
2.2.4.2 Normalisierung der DNA- bzw. RNA-Konzentration	37
2.2.5 Qualitätskontrolle der RNA	37
2.3 DNA-Methylierung am Intron 7 des FKBP5-Gens	38
2.3.1 Bisulfitkonvertierung	38
2.3.2 Amplifizierung des zweiten GRE des Introns 7 im FKBP5-Gen	39
2.3.3 PCR-Kontrolle: Gelelektrophorese	40
2.3.4 Aufreinigung	41
2.3.5 DNA-Sequenzierung	42
2.3.5.1 Sequenzierreaktion	42
2.3.5.2 Aufreinigung	43
2.3.5.3 Sequenzierung	43
2.3.6 Auswertung der Sequenz-Chromatogramme	44
2.4 Expressionsanalyse von 90 ncRNAs	47
2.4.1 Reverse Transkription	47
2.4.2 Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion	47
2.4.3 Auswertung der generierten ncRNA Daten	48
3 Ergebnisse	50
3.1 Durchflusszytometrie und DNA- und RNA-Extraktion	51
3.1.1 Anzahl der neuronalen und glialen Zellkerne bei Schizophrenie	51
3.1.2 DNA- und RNA-Menge	54
3.1.3 Qualitätskontrolle der RNA	55
3.2 DNA-Methylierung am Intron 7 des FKBP5-Gens	56
3.2.1 Ergebnis der Auswertung	56
3.2.2 Datenqualität	58
3.3 Expressionsanalyse von 90 nicht-kodierenden RNAs	60
3.3.1 Auswertung	60
3.3.1.1 Ermittlung der Kalkulationseinheit „Cq-Wert“	60
3.3.1.1.1 Berechnung des Cq-Werts	62
3.3.1.1.2 Umgang mit nicht berechneten Cq-Werten	63
3.3.1.2 Quantifizierungsstrategien	65
3.3.1.2.1 Exkurs: Zusammenhang zwischen RIN-Werten und Cq-Werten	66
3.3.1.2.2 Auswahl der Referenzgene	67
3.3.1.2.3 Normalisierung	69
3.3.1.2.4 Exkurs: Normfinder	71
3.3.1.3 Effizienzkorrektur	72
3.3.1.4 Statistik	73
3.3.1.4.1 Fold Change	73

3.3.1.4.2 Mann-Whitney U-Test	74
3.3.2 Resultate der Expressionsanalyse von 90 nicht-kodierenden RNAs	76
3.3.2.1 NcRNAs mit statistisch signifikantem Expressionsunterschied zwischen den schizophrenen Probanden und der Kontrollgruppe.....	76
3.3.2.1.1 Expressionsunterschied der RNAs Jpx, ST7OT und p53 mRNA in den neuronalen Zellkernen des Brodmann-Areals 10.....	78
3.3.2.1.2 Expressionsunterschied der ncRNAs LOC285194, RNCR3, TEA ncRNAs (family) und Malat1 in den neuronalen Zellkernen der Brodmann-Areale 17/18.....	80
3.3.2.1.3 Expressionsunterschied der lncRNA Har1B in den glialen Zellkernen des Brodmann-Areals 10.....	84
3.3.2.1.4 Expressionsunterschied der ncRNAs IPW, Kcnq1ot1, mascRNA, SNHG6, BACE1AS (family) und DHFR upstream transcripts (family) in den glialen Zellkernen der Brodmann-Areale 17/18.....	87
3.3.2.2 LncRNAs im Zusammenhang mit der Erkrankung Schizophrenie	91
3.3.2.3 Weitere untersuchte ncRNAs.....	93
4 Diskussion	94
4.1 Allgemeine Erwägungen zu Fall-Kontroll-Studien bei Schizophrenie	95
4.2 Anzahl neuronaler und glialer Zellkerne bei Schizophrenie	96
4.2.1 Anzahl der Neurone im präfrontalen Kortex bei Schizophrenie.....	98
4.2.2 Anzahl der Neurone im occipitalen Kortex bei Schizophrenie	98
4.2.3 Anzahl der Gliazellen im präfrontalen Kortex bei Schizophrenie	98
4.2.4 Anzahl der Gliazellen im occipitalen Kortex bei Schizophrenie	99
4.2.5 Unterschiede in der Methodik	99
4.2.6 Interpretation und Empfehlungen für weitere Studien	100
4.2.6.1 Analyse: Anzahl der Neurone bei Schizophrenie.....	100
4.2.6.1 Analyse: Anzahl der Gliazellen bei Schizophrenie.....	101
4.3 Veränderte ncRNA-Expression bei Schizophrenie	102
4.3.1. Veränderte RNA-Expression in den neuronalen Zellkernen des Brodmann-Areals 10	102
4.3.1.1 Jpx und Schizophrenie	102
4.3.1.2 ST7OT und Schizophrenie	103
4.3.1.3 p53 mRNA und Schizophrenie	103
4.3.2 Veränderte ncRNA-Expression in den neuronalen Zellkernen der Brodmann-Areale 17/18	103
4.3.2.1 LOC285194 und Schizophrenie.....	103
4.3.2.2 RNCR3 und Schizophrenie	104
4.3.2.3 TEA ncRNAs (family) und Schizophrenie	104
4.3.2.4 Malat1 und Schizophrenie	105

4.3.3	Veränderte Expression der ncRNAs Har1A und Har1B in den glialen Zellkernen des Brodmann-Areals 10.....	106
4.3.4	Veränderte ncRNA-Expression in den glialen Zellkernen der Brodmann-Areale 17/18	106
4.3.4.1	IPW und Schizophrenie.....	106
4.3.4.2	Kcnq1ot1 und Schizophrenie.....	107
4.3.4.3	mascRNA und Schizophrenie.....	108
4.3.4.4	SNHG6 und Schizophrenie	108
4.3.4.5	BACE1AS (family) und Schizophrenie	108
4.3.4.6	DHFR upstream transcripts (family) und Schizophrenie.....	109
4.3.5	Unveränderte Expression der ncRNAs DISC-2, Gomafu und Evf2 bei Schizophrenie	110
4.3.5.1	DISC-2	110
4.3.5.2	Evf2.....	111
4.3.5.3	Gomafu.....	111
4.3.6	Interpretation.....	112
4.3.6.1	Analyse der vorliegenden Arbeit	112
4.3.6.2	Empfehlung für weitere Studien	113
5	<i>Anhang</i>.....	114
5.1	Abkürzungen.....	115
5.2	Materialien	117
5.3	Ergebnisse der Durchflusszytometrie und der DNA/RNA-Extraktion	121
5.4	DNA-Methylierung am Intron 7 des FKBP5-Gens	128
5.5	Expressionsanalyse von 90 ncRNAs: Gemessene Cq-Werte.....	136
5.6	Expressionsanalyse von 90 ncRNAs: Ergebnisse	156
5.7	Abbildungsverzeichnis	182
5.8	Tabellenverzeichnis.....	184
5.9	Endnoten	187
6	<i>Danksagung</i>.....	216

1 Einleitung

1.1 Schizophrenie

1.1.1 Krankheitsbild und Therapie

Schizophrenie ist eine komplexe neuropsychiatrische Erkrankung [1-3] unter der weltweit etwa 1 % der Bevölkerung leidet [3-7].

Das Krankheitsbild setzt sich im Wesentlichen aus drei Symptomkategorien zusammen: Positivsymptome, Negativsymptome und kognitive Störungen [8]. Die Positivsymptome, wie Wahnvorstellungen, Halluzinationen und formale Denkstörungen [9, 10], führen zu einer gestörten und exaltierten Wahrnehmung der Realität [6, 10]. Im Gegensatz dazu äußern sich die Negativsymptome als Abflachung von Motorik, Sprache und Gefühlsregungen [6, 10]. Die kognitiven Störungen manifestieren sich als Defizit im kognitiven Leistungsbereich und als verminderte soziale Intelligenz [11]. Letztere führt zu einer gestörten Wahrnehmung der eigenen Person und wirkt einschränkend auf die soziale Interaktion [3].

Die Symptome aus den Kategorien der Positiv- bzw. Negativsymptome treten in unterschiedlichen Zeiträumen des phasenhaften Krankheitsverlaufs auf [9]. In der Regel dominieren in der Prodromalphase die Negativsymptome [9, 10], in akuten Krankheitsphasen die Positivsymptome und in chronischen Krankheitsphasen wiederum die Negativsymptome [10]. Die kognitiven Störungen bestehen typischerweise schon in der Prodromalphase und persistieren unabhängig von den Krankheitsphasen [6]. Erkrankte zeigen interindividuell unterschiedliche Symptome aus den drei Symptomkategorien, die auch in Bezug auf den Ausprägungsgrad variieren können [10]. Schizophrenie kann sich folglich vielgestaltig darstellen; das heterogene Krankheitsbild erschwert die Diagnosestellung [10].

Schizophrenie wird anhand des Auftretens typischer Symptome diagnostiziert. Da Ätiologie und Pathogenese weitgehend ungeklärt sind, fehlen Biomarker [12]. So werden zur Diagnostik die Kriterien anerkannter Klassifizierungssysteme wie beispielsweise des „Diagnostischen und statistischen Leitfadens für psychische Störungen“ (DSM-V) angewandt [5, 13, 14]. Meistens wird die Diagnose zwischen dem 20. und 35. Lebensjahr gestellt [2, 6], wenn das erste Mal eine akute Krankheitsepisode auftritt. Männer scheinen im Durchschnitt früher und mit ei-

1 Einleitung

nem Verhältnis von 1,4:1 häufiger als Frauen zu erkranken [3, 6, 15, 16]. Die akute Krankheitsphase zu Beginn der Erkrankung wird in der Regel von einer chronischen Krankheitsphase abgelöst [6]. Diese wiederum kann stagnieren, von weiteren akuten Phasen unterbrochen werden oder remittieren [6, 9]. Zu einer Ausheilung der Erkrankung kommt es nur selten [10].

Schizophrenie wird in allen Krankheitsphasen pharmakologisch und psychologisch therapiert, wobei in akuten Krankheitsphasen meistens eine stationäre Aufnahme notwendig ist [9]. Zur medikamentösen Therapie haben sich Präparate aus der heterogenen Gruppe der Antipsychotika bewährt; die Wahl des Präparats und der Dosis wird individuell bestimmt [9, 17]. Die Antipsychotika bewirken vor allem über die Linderung der Positivsymptome eine generelle Verbesserung des Krankheitszustandes [17]. Bei circa 30 % der Patienten tritt nur eine unzureichende Wirkung der Medikation ein. Neben dem verminderten Ansprechen auf den Wirkstoff könnte dafür auch eine mangelhafte Kooperation der Patienten ursächlich sein [6]. Bei therapieresistenten Patienten besteht die Möglichkeit über eine Elektrokrampftherapie (EKT) eine Verbesserung der Symptome zu erzielen. Bei der EKT wird im Gehirn des Patienten ein kurzzeitiger epileptischer Anfall ausgelöst, der sich häufig lindernd auf die Symptomatik auswirkt. Der genaue Wirkmechanismus der EKT ist nicht abschließend geklärt. Wahrscheinlich beruht die therapeutische Wirkung auf einer Konzentrationsänderung einiger Neurotransmitter im Gehirn, die durch den Anfall ausgelöst wird [6].

Insgesamt scheinen die therapeutischen Maßnahmen bei einigen Patienten eine Linderung der Krankheitssymptomatik zu bewirken. Eine Verbesserung der Langzeitprognose oder eine Heilung kann derzeit über die Medikation nicht erreicht werden [3]. Die Lebenserwartung der Erkrankten ist im Durchschnitt um circa 20 Lebensjahre vermindert [6, 9, 10]. Eine Verbesserung der Therapieoptionen und damit der Prognose setzt profundere neurobiologische Erkenntnisse über die bislang weitgehend ungeklärte Ätiologie und Pathogenese der Schizophrenie voraus [18].

1.1.2 Pathologie

Die Deskription pathologischer Veränderungen ist ein wichtiger Prozess, um sich der bislang wenig geklärten Ätiologie und Genese der Erkrankung Schizophrenie zu nähern.

1.1.2.1 Makroskopische Veränderungen im Gehirn schizophrener Probanden

Die Erkrankung Schizophrenie scheint mit einer Verminderung des Hirngewebes [5, 19-23] und einer Vergrößerung der Hirnventrikel [5, 20, 22, 24] einher zu gehen. Die Gewebeminderung ist in verschiedenen Hirnarealen unterschiedlich stark ausgeprägt; besonders deutlich tritt sie im präfrontalen Kortex, im Temporallappen und im Hippocampus zu Tage [5, 21]. Noch ist unbekannt, ob die Verminderung des Hirngewebes und die Vergrößerung der Hirnventrikel Auslöser oder Folge der Erkrankung bzw. der Therapie sind [22]. Eine Korrelation zwischen dem Ausprägungsgrad der Veränderungen und der Schwere der Erkrankung scheint nicht zu bestehen [25].

Auch zu diagnostischen Zwecken lassen sich die makroskopischen Veränderungen nicht nutzen [20, 21]: Zum einen variiert die Größe des Hirnvolumens und der Ventrikel in der Gesamtbevölkerung so stark, dass Überschneidungen zwischen dem Normalbereich und den krankheitsbedingten Veränderungen bestehen [5, 22]. Zum anderen sind die Befunde nicht spezifisch für Schizophrenie, da sie auch bei anderen psychiatrischen Erkrankungen beobachtet werden [21].

1.1.2.2 Mikroskopische Veränderungen im Gehirn schizophrener Probanden

Viele Studien deuten darauf hin, dass Schizophrenie mit Veränderungen in der Anzahl der Zellen des Zentralen Nervensystems (ZNS) einhergeht [2, 20, 21, 26, 27].

Die vorherrschenden Zellpopulationen im ZNS sind die Neurone und die Gliazellen. Neurone übertragen durch elektrische und chemische Signale Informationen zwischen dem Gehirn und der Peripherie des Organismus. Sie bestehen aus einem Zellkörper, der den Zellkern enthält, Dendriten, die Signale zum Zellkern des Neurons leiten, und einem Axon, das Signale vom Neuron weiterleitet. Über

1 Einleitung

Dendriten, Axone und Synapsen stehen Neurone miteinander und mit weiteren Zellen, beispielsweise Muskelzellen, in Kontakt. So können Signale weitergeleitet und Reaktionen, beispielsweise Muskelkontraktionen, ausgelöst werden [28].

Die Gliazellen sind eine heterogene Gruppe, die in die Untergruppen Astrozyten, Oligodendrozyten und Mikrogliazellen unterteilt wird [29]. Die Funktion der Gliazellen scheint im Wesentlichen in der Aufrechterhaltung und Regulation neuronaler Funktionen zu liegen [27]: Oligodendrozyten bilden im ZNS die Myelinscheiden um die Axone und ermöglichen dadurch die hohe Signalübertragungsgeschwindigkeit der Neurone. Astrozyten scheinen unter anderem an der Regulation des Wasser- und Ionenhaushalts, der Ernährung der Neurone sowie der Aufrechterhaltung der Blut-Hirn-Schranke beteiligt zu sein [27]. Mikrogliazellen sind, schlagwortartig, die Immunzellen (Makrophagen) des ZNS [20, 29].

Die Abbildung 1.1 gibt einen Überblick über die funktionelle Beziehung zwischen Neuronen und Gliazellen.

Im Gehirn beträgt die Anzahl der Neurone nach aktuellem Wissensstand in etwa $86,1 \pm 8,1$ Milliarden, die Anzahl der Gliazellen in etwa $84,6 \pm 9,8$ Milliarden [30, 31]. Das Verhältnis von Gliazellen und Neuronen scheint, bezogen auf das gesamte Gehirn, ausgewogen zu sein, wobei in einzelnen Hirnarealen (z.B. Kleinhirn: 19 % Gliazellen) deutliche Abweichungen beobachtet werden [30]. Im grauen Kortexgewebe, das in der vorliegenden Arbeit untersucht wird, überwiegen mit etwa 58 % die Gliazellen [30, 32]; die Oligodendrozyten sind in diesem Bereich mit 75 % die dominierende Subpopulation der Gliazellen [30].

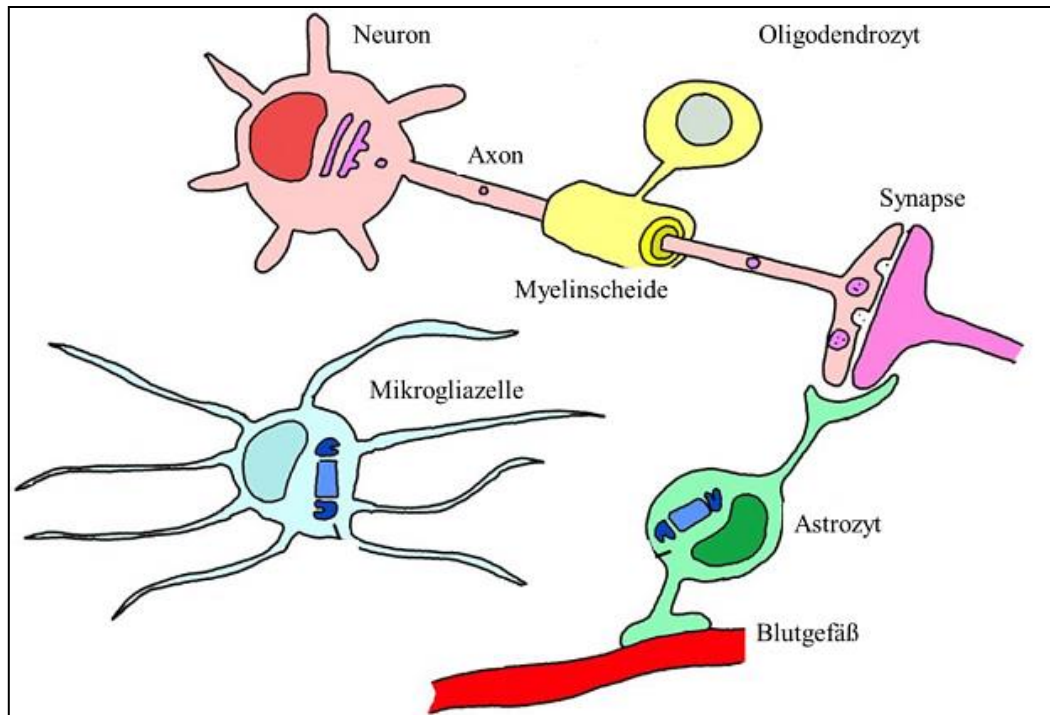


Abbildung 1.1: Zusammenspiel zwischen einem Neuron und den Gliazellen

Die Graphik stellt die funktionelle Beziehung zwischen einem Neuron und den Gliazellen (Oligodendrozyten, Mikrogliazellen und Astrozyten) dar. Die Graphik ist der Arbeit von Jasen et al. entnommen [33].

Studien, die sich mit der Anzahl der Neurone in einzelnen Hirnregionen bei Schizophrenie beschäftigen, zeigen unterschiedliche Ergebnisse [5]: Einige Studien belegen eine Abnahme der Neurone bei Schizophrenie [20, 34-36], während andere keine Abweichung der Neuronenanzahl bei Schizophrenie nachweisen [2, 3, 5, 34, 37, 38]. Darüber hinaus gibt es Hinweise auf eine Verkleinerung der Neurone [5], neuronale Dysfunktionen [38] und Normabweichungen in der Neurogenese [2] bei Schizophrenie. Insgesamt ist noch unklar, ob neuronale Veränderungen typisch für Schizophrenie sind und ob sie eine Ursache oder eine Reaktion auf die Erkrankung darstellen.

Ein Verlust von Oligodendrozyten [2, 36, 39, 40] und eine veränderte Expression von Genen, die spezifisch für die Funktion der Oligodendrozyten sind [27, 41], ist bei Schizophrenie mehrfach publiziert. Darüber hinaus gibt es Hinweise auf eine gestörte Myelierung der Nervenfasern bei Schizophrenie [39, 42]. Die Abnahme

1 Einleitung

der Myelierung könnte durch einen Verlust von Oligodendrozyten bei Schizophrenie ausgelöst werden [27]. Die Myelierung von Nervenfasen wird erst im frühen Erwachsenenalter abgeschlossen. Dies fällt zeitlich mit dem typischen Erkrankungsausbruch der Schizophrenie in der frühen Adoleszenz zusammen [20, 27].

Der Zusammenhang zwischen Astrozyten bzw. Mikrogliazellen und Schizophrenie ist weit weniger erforscht: Es gibt Hinweise darauf, dass bei schizophrenen Probanden die Expression von Genen verändert ist, die für die Funktion der Astrozyten relevant sind [27, 43]. Ob auch die Anzahl der Astrozyten bei Schizophrenie verändert ist, ist nicht bekannt [20, 43]. Hinsichtlich der Mikrogliazellen legen einige Studien nahe, dass Schizophrenie mit einer erhöhten Dichte der Mikrogliazellen in einigen Hirnregionen einhergeht [20].

Eine Gliose, also die pathologische Zunahme von degenerierten Gliazellen im ZNS, ist bei Schizophrenie nicht beobachtet worden [2, 5, 21, 44].

1.1.2.3 Veränderungen in den Brodmann-Arealen 10 und 17/18 bei Schizophrenie

Die vorliegende Arbeit basiert auf der Untersuchung des grauen Kortexgewebes der Brodmann-Areale 10 und 17/18.

Das Brodmann-Areal 10 gehört zum präfrontalen Kortex (PFC), der die Brodmann-Areale 8-13, 24, 32, 46 und 47 umfasst [45] (vgl. Abbildung 1.2). Die grundlegenden Funktionen des PFC werden in der Gedächtnisbildung sowie in der Planung und Ausführung von Handlungen gesehen [11, 45]. Schizophrenie scheint mit einer deutlich ausgeprägten Volumenminderung [19, 21], einer unzureichenden Durchblutung und einem eingeschränkten Stoffwechsel [11] sowie einer fehlerhaften Aktivierung des PFC bei einigen Gedächtnisleistungen assoziiert zu sein [38, 46].

Das Brodmann-Areal 10 (BA 10) ist bei Menschen, im Vergleich zu anderen Primaten, ein großes Hirnareal, dessen Entwicklung mindestens bis in die Adoleszenz andauert. Wahrscheinlich spielt das BA 10 eine wichtige Rolle für Teile des Langzeitgedächtnisses, Multitasking, Selbstreflexion [47] und insbesondere für das prospektive Gedächtnis. Das prospektive Gedächtnis ermöglicht das Ausfüh-

ren von Tätigkeiten zu der rechten Zeit in der geplanten Art und Weise [48]. Ein Zusammenhang zwischen Schizophrenie und einer Störung im BA 10 wird im Wesentlichen aus zwei Gründen vermutet: Zum einen scheint das BA 10 bei schizophrenen Probanden verkleinert zu sein [47, 49]. Zum anderen betrifft das Störungsbild der Schizophrenie, insbesondere die kognitiven Störungen, viele Funktionen, die dem BA 10 zugeordnet werden [6, 11, 50].

Die untersuchten Brodmann-Areale 17/18 (BA 17/18) gehören zum occipitalen Kortex (OC), der außerdem das Brodmann-Areal 19 umfasst (vgl. Abbildung 1.2). Der OC wird auch als visueller Kortex bezeichnet, weil die Funktion dieser Hirnregion in der Verarbeitung visueller Reize liegt [13]. Im Zusammenhang mit der Erkrankung Schizophrenie ist eine Volumenabnahme des OC vor allem bei Patienten mit stark ausgeprägten Symptomen und schlechter Prognose beschrieben worden. Dieses Phänomen wird auch als Posteriorisierung bezeichnet. Posteriorisierung bedeutet: Je schlechter die Prognose eines Erkrankten, desto geringer ist das Hirnvolumen in den Hirnarealen, die weiter posterior liegen [23]. Darüber hinaus gibt es Hinweise darauf, dass die häufig auftretenden Halluzinationen mit Veränderungen im occipitalen Kortex zusammenhängen könnten [51].

Insgesamt ist der Zusammenhang zwischen Schizophrenie und pathologischen Veränderungen im PFC deutlich besser belegt und häufiger untersucht als der Zusammenhang mit Veränderungen im OC [13].

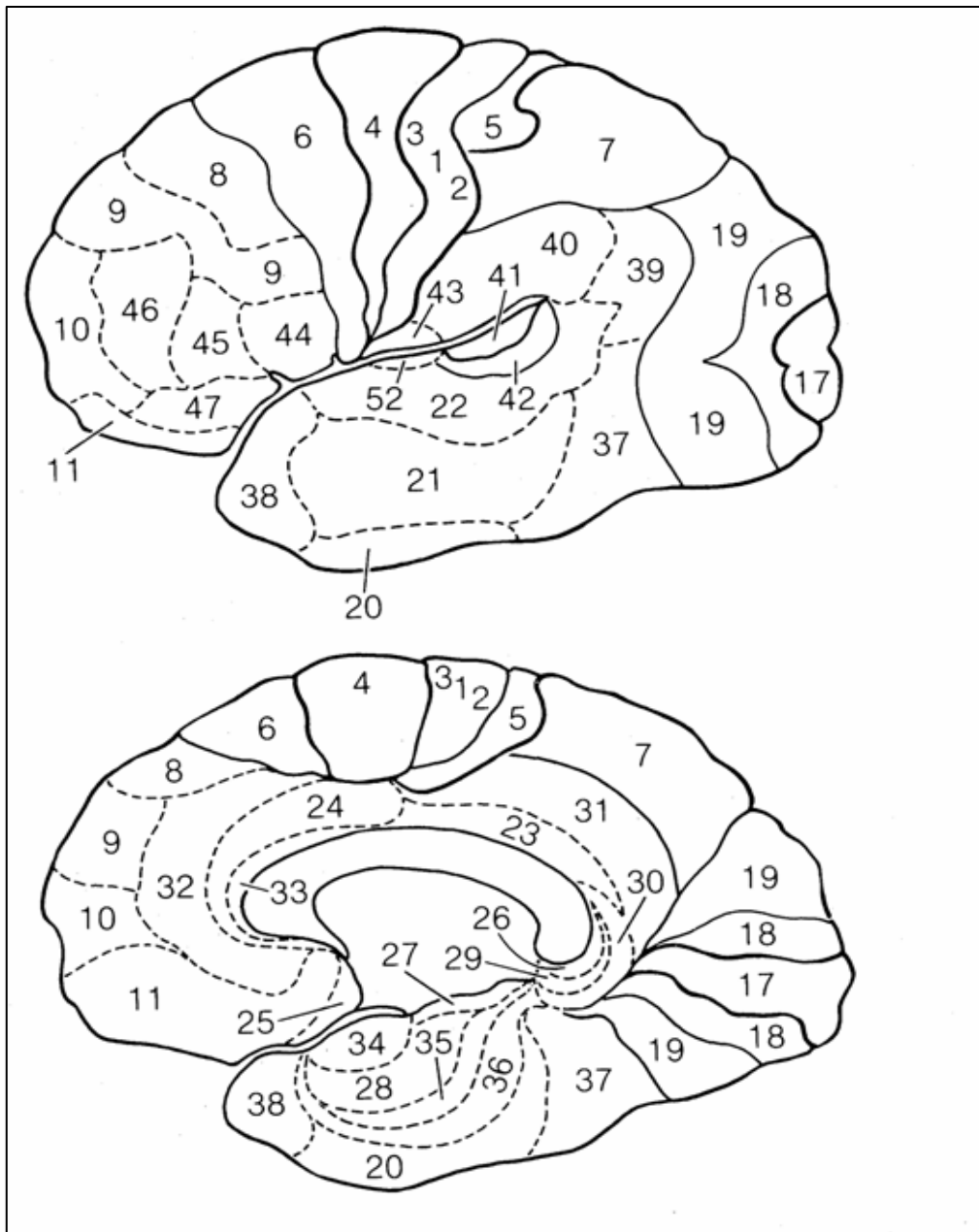


Abbildung 1.2: Topologie der Brodmann-Areale [52]

Dargestellt ist die Einteilung des Gehirn in Brodmann-Areale (obere Abbildung: laterale Ansicht des Gehirns, untere Abbildung: medialer Sagittalschnitt).

1.1.2.4 Mögliche Zusammenhänge zwischen Pathologie und Pathogenese

Schizophrenie ist, wie in den vorherigen Kapiteln dargestellt, mit Veränderungen auf makroskopischer und zellulärer Ebene im Gehirn korreliert [20]. Ob die Veränderungen eine Ursache oder eine Folge der Erkrankung sind und welche Rolle sie für die Pathogenese spielen, ist nach wie vor unbekannt. Zu diesen Fragestellungen werden in der Wissenschaft unterschiedliche, teils kontroverse Theorien vertreten:

Die heute als Schizophrenie bekannte Erkrankung definierte Emil Kraepelin 1893 zum ersten Mal unter dem Namen „dementia praecox“ als eigenständiges Krankheitsbild [2, 53]. Die zugrunde liegende Beobachtung war, dass die Erkrankung zu einem Demenz-ähnlichen Krankheitsbild führt, aber schon im frühen Erwachsenenalter beginnt [2, 9]. Die Einordnung der Schizophrenie als klassische neurodegenerative Erkrankung wird heute kritisch gesehen, da auf zellulärer Ebene typische Anzeichen für neurodegenerative Prozesse wie eine Gliose fehlen [2, 5, 21, 44]. Begleitende, aber untergeordnete neurodegenerative Prozesse sind trotzdem nicht auszuschließen, da sich die morphologischen Veränderungen, insbesondere die Volumenabnahme des grauen Kortexgewebes, bei Schizophrenie progressiv verhalten können [44]. Die Progredienz könnte allerdings auch die Folge der therapeutischen Intervention sein [20].

Falkai et al. vertreten die These, dass Einschränkungen von regenerativen Prozessen – vor allem im Gehirn – ein wichtiger Bestandteil der Pathogenese sein könnten. Die eingeschränkte Regenerationsfähigkeit könnte unter anderem auf eine Dysfunktion der Oligodendrozyten oder auf Defizite in der Neurogenese zurückgehen, die die Kommunikationsprozesse im Gehirn stören [2, 44].

Eine heute gängige These ist, dass Störungen in der (Hirn)-entwicklung eine kausale Rolle für Schizophrenie spielen könnten [20, 44], denn die makroskopischen Veränderungen, wie die Volumenminderung des Gehirns, können schon bei der Diagnosestellung beobachtet werden [20, 44]. Gegen diese Hypothese lässt sich einwenden, dass die Erkrankung erst im frühen Erwachsenenalter ausbricht. Somit würden pränatal entstehende, pathologische Veränderungen mehrere Jahre im Verborgenen bleiben, ohne die Erkrankung auszulösen [5, 20]. Allerdings dauern

1 Einleitung

einige Entwicklungsprozesse, wie schon beispielsweise angeführt die Myelierung von Nervenfasern und die Entwicklung des Brodmann-Areals 10, bis in das frühe Erwachsenenalter an [20, 47]. Der Abschluss dieser Entwicklungsprozesse könnte durchaus mit dem Erkrankungsausbruch zusammen fallen.

1.1.3 Ätiologie der Schizophrenie

1.1.3.1 Genetische Prädisposition

Die genetische Prädisposition scheint für die Erkrankung Schizophrenie ein äußerst wichtiger ätiologischer Faktor zu sein [5, 54].

Schizophrenie tritt intrafamiliär gehäuft auf [54]. Das Erkrankungsrisiko von Familienmitgliedern erkrankter Personen korreliert positiv mit dem Verwandtschaftsgrad (vgl. Tabelle 1.1) [16].

Tabelle 1.1: Risikofaktoren für Schizophrenie

Verwandtschaftsgrad	Erkrankungsrisiko	Verwandtschaftskoeffizient
Monozygote Zwillinge	50-70 %	100 %
Kinder: beide Eltern erkrankt	40-60 %	
Dizygote Zwillinge	9-18 %	ø 50 %
Kinder: ein Elternteil erkrankt	13-17 %	50 %
Geschwister	ca. 9 %	ø 50 %
Großeltern	ca. 5 %	25 %
Onkel, Tanten	2-3 %	ø 25 %
<i>Allgemeinbevölkerung</i>	<i>ca. 1 %</i>	

Die Tabelle enthält Informationen aus den Arbeiten von Tandon et al. [16] und Moises et al. [54].

Verwandtschaftskoeffizient: Wahrscheinlichkeit dieselbe Erbinformation geerbt zu haben [55]

Um die Bedeutung der genetischen Komponente für eine Erkrankung einschätzen zu können, wird die Erblichkeit bestimmt. Erblichkeit (h^2) ist der Anteil der Varianz der Ausprägung eines Merkmals (bzw. einer Erkrankung), der durch die genetische Varianz innerhalb einer Population erklärt werden kann [56, 57]. Für Schizophrenie liegt die Erblichkeit (h^2) bei etwa 80 % [2, 9, 16, 57-62]. Damit ist die Erblichkeit der Schizophrenie vergleichbar mit der Erblichkeit der Körpergröße (h^2 Männer = 87 % - 93 %; h^2 Frauen = 68 % - 90 %) [62] oder mit der Erblichkeit psychischer Störungen, wie Autismus-Spektrum-Störungen (h^2 = 80 %) oder Bipolaren Störungen (h^2 = 75 %) [57]. Viele neurodegenerative Erkrankungen, wie Morbus Alzheimer (h^2 = 58 %) [57] oder Parkinson (h^2 = 34 %) [62], oder psychiatrische Erkrankungen, wie Depression (h^2 = 37 %) [57, 62], weisen eine geringere Erblichkeit als Schizophrenie auf.

Welche genetischen Veränderungen die hohe Erblichkeit von Schizophrenie begründen, ist bislang nicht geklärt [5, 63]: Keine der zahlreich beobachteten, genetischen Veränderungen bei Schizophrenie tritt bei allen Erkrankten auf [16] oder scheint spezifisch für die Erkrankung zu sein [57]. Zu den beobachteten genetischen Veränderungen zählen Polymorphismen, wie Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNP = Single Nucleotide Polymorphism) oder Kopiezahlvariationen (CNV = Copy Number Variation) [7, 57], an über 100 Genloki [2, 7, 64]. Die detektierten Genloki sind auf verschiedenen Chromosomen lokalisiert, wobei auf einzelnen Chromosomen lokale Häufungen vorkommen (Überblick bei Tandon et al. [16]). Auch Chromosomenaberrationen, wie die Deletion von 22q11, die Translokation von 1q42/11q14 und Veränderungen am X-Chromosom, wurden gezeigt [16]. Deren Auftreten scheint aber auf einzelne Familien begrenzt zu sein [57].

1.1.3.2 Umweltfaktoren

Neben der genetischen Prädisposition scheinen Umweltfaktoren in die Ätiologie der Schizophrenie involviert zu sein [61]. Dizygote Zwillinge haben beispielsweise ein leicht erhöhtes Risiko an Schizophrenie zu erkranken als andere Geschwister (siehe Tabelle 1.1). Die genetische Ähnlichkeit liegt in beiden Fällen durch-

1 Einleitung

schnittlich bei 50 %; aber es liegt in der Natur der Sache, dass dizygote Zwillinge mehr Umweltfaktoren teilen als andere Geschwister [54].

Mehrere Studien belegen Assoziationen der Erkrankung Schizophrenie mit Umweltfaktoren wie Infektionen oder Fehlernährung der Mutter während der Schwangerschaft [16, 65], Geburtskomplikationen, Trennung der Eltern, Viktimisierung durch Gewaltverbrechen, Vernachlässigung, Tod eines Verwandten [16, 66], städtisches Leben, Migration oder Cannabis-Konsum [16, 60, 67, 68]. Allen genannten Umweltfaktoren ist gemein, dass sie im Organismus Stress auslösen. Stress wird als Zustand definiert, indem die Homöostase/das Gleichgewicht eines Organismus bedroht ist [69] und der Körper durch Aktivierung verschiedener körpereigener Regulationsmechanismen versucht, die Homöostase wieder herzustellen (Stressreaktion) [69]. Starke existentielle Stressexpositionen insbesondere in der Entwicklungsphase eines Organismus scheinen allgemein mit dem Risiko für psychiatrische Erkrankungen zu korrelieren [70].

Ein Bindeglied zwischen hoher Erblichkeit und dem Einfluss der Umweltfaktoren, könnte in einer stressinduzierten Veränderung des Epigenoms (siehe unten) liegen. Von Gottesmann, Shields und Hanson wurde eine epigenetische Causa erstmals 1982 in ihrer Monographie „Schizophrenie: Das epigenetische Rätsel“ diskutiert (zitiert nach: [71, 72]).

1.2 Epigenetik

Conrad Hal Waddington prägte 1940 den Neologismus Epigenetik [73, 74], um die bis dahin getrennten Fachbereiche Entwicklungsbiologie und Genetik zusammenzuführen [71]. Waddington versprach sich von dieser Verbindung ein besseres Verständnis der Mechanismen, die zur Ausprägung des Phänotyps in der Embryonalentwicklung führen [71, 74, 75]. Seither hat sich die Begriffsdefinition erweitert und präzisiert. Heute versteht man unter Epigenetik verschiedene molekulare Mechanismen, die an der Regulation der Genexpression über die gesamte Lebenszeit mitwirken. Zu diesen epigenetischen Mechanismen zählen zum einen DNA-Methylierungen und Histonmodifikationen, die zusätzlich zur genetischen Informationen an der DNA vorkommen, und zum anderen nicht-kodierende RNAs (ncRNAs), die von genomischer DNA transkribiert werden [57, 75-77]. Kurz zusammengefasst scheinen die epigenetischen Mechanismen über die Aktivierung bzw. Inaktivierung von Genen zu beeinflussen, wie die genetische Information „genutzt“ wird [78-80], und dadurch den Phänotyp entscheidend zu prägen [81].

Die Gesamtheit aller epigenetischer Variationen eines Individuums wird als Epigenom bezeichnet [82]. Während die DNA eines Individuums grundsätzlich in allen Zellen über die Lebensdauer (Ausnahme: Auftreten von Mutationen) identisch ist, unterscheidet sich das Epigenom zwischen verschiedenen Zellpopulationen und verschiedenen Geweben [80]. Das zelltypspezifische epigenetische Profil scheint innerhalb der Zellpopulation stabil zu sein [77, 78] und eine Zellpopulation durch Genregulation an ihre jeweiligen Funktionen anzupassen (Zelldifferenzierung) [73].

Das Epigenom scheint sich im Laufe des Lebens zu verändern [78]. Zum einen sind die Veränderungen genetisch angelegt und korrelieren mit den Entwicklungsphasen des Organismus [81]. Zum anderen können Veränderungen am Epigenom durch Umweltfaktoren, insbesondere Stress, ausgelöst werden [79, 81, 83]. Dazu passend unterscheiden sich selbst monozygote Zwillinge, die per se hinsichtlich des Genotyps identisch sind, mit zunehmendem Lebensalter immer deut-

licher hinsichtlich ihres Epigenoms [77]. Wie weit sich der Einflussbereich der Umweltfaktoren erstreckt, ist noch nicht bekannt [78].

Gerade bei Erkrankungen wie Schizophrenie, die mit einer hohen Erbllichkeit aber unklarer genetischer Causa einhergehen, könnten epigenetische Studien aufschlussreich sein [80]: Die epigenetische Analyse könnte die sachgerechte Interpretation genetischer Varianz ermöglichen, da neben die Information über den Genotyp die Information über den Aktivitätszustand der Gene tritt [78]. Epigenetische Veränderungen könnten dabei sowohl an der Ursache der Erkrankung beteiligt sein als auch eine regulatorische Kompensationsreaktion auf die Erkrankung sein [77]. Die detaillierte Analyse epigenetischer Modifikationen kann somit helfen die Ätiologie einer Erkrankung zu verstehen, Biomarker zu identifizieren, die die Diagnostik und die Kontrolle der Therapie erleichtern, oder die Therapieoptionen zu verbessern [12, 80, 84-87].

Zwei epigenetische Mechanismen, DNA-Methylierung und ncRNAs, die in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden, werden im Folgenden näher besprochen.

1.2.1 DNA-Methylierung

Die DNA-Methylierung ist ein gut dokumentierter epigenetischer Mechanismus. Sie wirkt an der DNA-Base Cytosin. Modifizierte Cytosin-Basen sind an der Position 5 ihres Pyrimidinrings methyliert und werden 5-Methylcytosin (5mC) genannt [70, 73, 76, 78, 79, 88, 89]. Enzyme aus der DNMT-Familie katalysieren die DNA-Methylierung (Abbildung 1.3) [73, 76, 89].

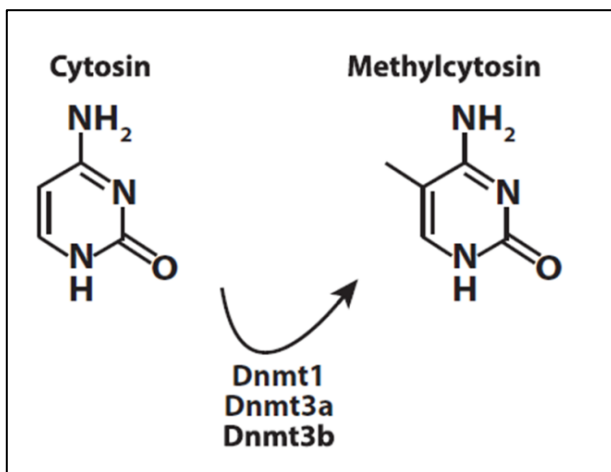


Abbildung 1.3: DNA-Methylierung [90]

Die Abbildung zeigt die Reaktionsgleichung der DNA-Methylierung.

DNA-Methylierungen können an allen Cytosin-Basen im Genom auftreten. Die DNA-Sequenz als solche bleibt von der Methylierung unbeeinflusst [91, 92]; d.h. unabhängig von der Methylierung enthält ein Gen die Information für dieselbe RNA bzw. dasselbe Protein [73]. DNA-Methylierungen bewirken im Wesentlichen eine lokale Verdichtung des Chromatins (Heterochromatin), sodass die Transkriptionsrate des methylierten DNA-Abschnitts vermindert wird [93].

Cytosin-Basen, die im Genom innerhalb von Cytosin-Phosphat-Guanin-Dinukleotiden (CpGs) vorkommen, sind zu etwa 80 % methyliert [83, 90, 93]. CpGs liegen häufig in repetitiven DNA-Sequenzen außerhalb von Proteinkodierenden Genabschnitten [73, 94]. Im Gegensatz dazu sind Cytosin-Basen, die sich innerhalb von CpG-Inseln befinden, in der Regel nicht methyliert (Ausnah-

me: Vorwiegend methylierte CpG-Inseln am inaktivierten X-Chromosom [76]). CpG-Inseln sind Cytosin-Guanin-reiche Sequenzen, die im Promotorbereich von etwa 60 % aller Gene auftreten [73, 76, 83, 89, 92]. Nicht-methylierte CpG-Inseln sind erforderlich dafür, dass ein nachfolgendes Gen abgelesen werden kann [73]; dementsprechend scheint das verstärkte Auftreten von DNA-Methylierungen innerhalb der CpG-Inseln eine transkriptionelle Genstilllegung auszulösen [91-93].

DNA-Methylierungen entwickeln sich im Genom bereits in der frühen Phase der Embryogenese [76] und scheinen an der Regulation wichtiger Prozesse der menschlichen Entwicklung, etwa X-Chromosom-Inaktivierung, Zelldifferenzierung und Imprinting, beteiligt zu sein [83, 92, 95]. Imprinting (auch genomische Prägung genannt) bedeutet, dass epigenetisch reguliert wird, ob das mütterliche oder das väterliche Allel eines Genes exprimiert wird [73]. Dem Imprinting unterliegen etwa 50 Gene [96]. Die Wirkung des Imprintings kann auf die Embryonalentwicklung beschränkt sein oder die gesamte Lebenszeit andauern; auch eine Begrenzung der Wirkung auf bestimmte Gewebe kommt vor [97].

Im Laufe des Lebens nimmt die Anzahl der DNA-Methylierungen wohl physiologischerweise tendenziell ab [76]. Trotzdem kommen den DNA-Methylierungen auch im erwachsenen Organismus wichtige Aufgaben zu, etwa bei der Regulation bestimmter Hirnfunktionen [76, 90] und bei der Reparatur und Stabilisierung des Genoms [76, 98]. Fehlregulationen der DNA-Methylierung scheinen mit zahlreichen Erkrankungen, allen voran Tumorerkrankungen, assoziiert zu sein [76, 98].

1.2.2 DNA-Methylierung und Schizophrenie

Schizophrenie scheint mit Veränderungen der DNA-Methylierung insbesondere an den Genen GAD67, RELN, COMT, SOX10, FOXP2, HTR2A, BDNF und FKBP5 zu korrelieren [8, 41, 64]. Die vorliegende Arbeit thematisiert den Zusammenhang zwischen der DNA-Methylierung am FKBP5-Gen und der Erkrankung Schizophrenie.

Das FKBP5-Gen kodiert für ein Protein, das an der Stressregulation im Körper beteiligt ist [99, 100]. Das FKBP5-Protein ist intrazellulär an den Glucocorticoidrezeptor gebunden. Bei Stressreaktionen werden Glucocorticoide in die Blut-

bahn ausgeschüttet. Intrazellulär binden die Glucocorticoide an Glucocorticoidrezeptoren, wodurch unter anderem die FKBP5-Proteine an den Glucocorticoidrezeptoren durch FKBP4 ausgetauscht werden [77, 101, 102]. Die Glucocorticoidrezeptoren translozieren in den Zellkern und führt über die Bindung an Glucocorticoid-Response-Elemente (GREs), die spezifische Gensequenzen zur Bindung von Glucocorticoidrezeptoren darstellen [103], zu einer verstärkten Transkription des FKBP5-Proteins [77, 101, 102]. Die Erhöhung der intrazellulären FKBP5-Konzentration setzt sodann die Sensitivität der Glucocorticoidrezeptoren für Glucocorticoide herab [77, 100-102].

Unter anderem von Klengel et al. wurden einige SNPs (Einzelnukleotid-Polymorphismen) im Intron 2 des FKBP5-Gens erforscht [57, 67, 100]. Bei einer genetischen Variante, die als Risikovariante bezeichnet wird, ist die Konformation des Gens am Intron 2 verändert. Die veränderte Konformation führt zu erhöhten Glucocorticoid-Spiegeln im Blut und zur verstärkten Expression von FKBP5 nach einer Glucocorticoidrezeptor-Aktivierung durch Glucocorticoide bei einer Stressreaktion [100, 101, 104]. In der Folge ist auch die Glucocorticoidrezeptor-Sensitivität stärker herabgesetzt, sodass weniger Glucocorticoide binden können. Dadurch werden Stressreaktionen erheblich verlängert [70, 101, 102].

Bei einigen Trägern der Risikovariante wurde zusätzlich eine epigenetische Demethylierung im zweiten GRE des Introns 7 des FKBP5-Gens beobachtet [67, 99, 101]. Studien weisen auf eine Korrelation zwischen dem Auftreten der Demethylierung und einem erlebten Trauma in der Kindheit hin. Die Daten der Studie von Klengel et al. zeigen bei Trägern der genetischen Risikovariante, die ein Trauma in der Kindheit erlitten haben, eine Demethylierung um 12,3 % im zweiten GRE am Intron 7 [67, 77, 99-101]. Es wird vermutet, dass die Demethylierung durch das Trauma in der Kindheit ausgelöst wird. Ein Trauma scheint sich nur bei Trägern der Risikovariante auszuwirken [67, 99, 100]. Bei Trägern von genetischen Nicht-Risikovarianten, die ein Trauma erlebt haben, wurde keine Demethylierung beobachtet [100]. Auch ein Trauma im Erwachsenenalter scheint sich, selbst bei Trägern der Risikovariante, nicht als Demethylierung am Intron 7 auszuwirken [77, 100].

1 Einleitung

Die Demethylierung scheint die Transkription des FKBP5-Proteins bei einer Stressreaktion noch zusätzlich zu verstärken, obgleich die Transkription durch die genetische Risikovariante ohnehin schon erhöht ist [67]. Häufig entsteht eine Glucocorticoidrezeptor-Resistenz [100, 102].

Das Risiko einer psychiatrischen Erkrankung scheint für Träger der Risikovariante am Intron 2 mit zusätzlicher Demethylierung im Intron 7 deutlich erhöht zu sein [67, 99-101]. Daskalakis et al. halten eine Störung des Stresssystems in Form einer epigenetischen Modifikation des FKBP5-Gens auch bei der Erkrankung Schizophrenie für einen möglichen ätiologischen Faktor [67].

1.2.3 Nicht-kodierende RNAs

Nicht-kodierende RNAs (ncRNA = non-coding RNA) sind Transkripte von DNA-Abschnitten, die nicht für Proteine kodieren [8].

Das menschliche Genom besteht nach aktuellem Kenntnisstand aus $3,3 \times 10^9$ Basenpaaren [62]. Es enthält in etwa 21.000 Protein-kodierende Gene [62, 105], die nur einen sehr kleinen Teil des Genoms ausmachen [62, 106, 107]. Zum größten Teil besteht das Genom aus ncRNAs [62, 108]. Den ncRNAs wurde früher keine Funktion zugeschrieben [109], weil die Aufgabe einer RNA nur in der Informationsübermittlung von der DNA zur Proteinherstellung gesehen wurde. Mittlerweile gibt es Hinweise darauf, dass die Anzahl nicht-kodierender Sequenzen mit der biologischen Komplexität einer Spezies korreliert [110] und Unterschiede hinsichtlich der ncRNAs entscheidend für interindividuelle Unterschiede innerhalb einer Spezies sein können [111].

Die Gruppe der nicht-kodierenden RNAs ist groß und heterogen. Eingeteilt werden die ncRNAs nach dem formalen Kriterium der Länge ihrer Basenpaare. Kurze ncRNAs sind bis zu 200 Nukleotide lang. Zu ihnen gehören die microRNAs, die vermutlich an der Regulation von ungefähr 60% aller Protein-kodierender Gene beteiligt sind [108]. Die mittleren ncRNAs sind zwischen 60 und 300 Nukleotide lang. Zu dieser Gruppe gehören die small nucleolar RNAs (snoRNA). Die langen ncRNAs (lncRNAs) sind mehr als 200 Nukleotide lang [108, 112, 113]; sie sind ein Schwerpunktthema der vorliegenden Arbeit (siehe Kapitel 1.2.4).

ncRNAs scheinen viele verschiedene, wichtige Funktionen im Organismus zu erfüllen. Dazu gehören die Beeinflussung der Proteinbiosynthese, der DNA-Methylierung und des Chromatinstatus [108, 114]. Dadurch scheinen ncRNAs sowohl an der Regulation wichtiger Entwicklungsprozesse im Organismus, wie Imprinting und Zelldifferenzierung, als auch an der epigenetischen Regulation der Genexpression mitzuwirken [108]. Auch für die Gehirnentwicklung und die Regulation von Gehirnfunktionen, beispielsweise Erinnerungsvermögen und Stressantwort, sollen ncRNAs eine entscheidende Rolle spielen [108].

1.2.4 LncRNAs

Die Anzahl der lncRNAs im Genom wird auf ungefähr 59.000 geschätzt [115], wobei über viele lncRNAs bislang wenig bekannt ist.

Die große Gruppe der lncRNAs wird nach ihrer Lage im Genom weiter unterteilt [116]: Eine Subgruppe bilden die lncRNAs, die entweder in Introns, Promotoren oder Enhancern von Protein-kodierenden DNA-Sequenzen vorkommen. Die zweite Subgruppe bilden die Antisense-Transkripte, die parallel zu einer Protein-kodierenden Sequenz auf dem gegenläufigen DNA-Strang vorkommen. [116]. Die dritte Subgruppe bilden die lncRNAs, die zwischen Protein-kodierenden Gensequenzen liegen; sie werden als lincRNA („long intergenic non-coding RNAs“) bezeichnet [116].

LncRNAs scheinen im Anschluss an die Transkription meistens im Zellkern zu bleiben [117] und mit RNAs, DNA-Abschnitten und/oder Proteinen zu interagieren [113, 116, 118]. Die Interaktion soll mit kodierenden und nicht-kodierenden DNA-Abschnitten sowie mit benachbarten oder weiter entfernten Regionen des Genoms möglich sein [119]. Hauptsächlich scheinen lncRNAs ihre Wirkung über die Regulation des Chromatinstatus (Heterochromation/Euchromatin) zu entfalten [108].

Insgesamt scheinen lncRNAs wichtig für die Entwicklung eines Organismus, insbesondere für das Imprinting, zu sein [108]. Im Gehirn sind lncRNAs vergleichsweise stark exprimiert, weswegen den lncRNAs eine wichtige Rolle für zentrale

Hirnfunktionen zukommen könnte. Beispielweise scheinen lncRNAs an der Zelldifferenzierung von neuronalen und glialen Subtypen beteiligt zu sein [108].

1.2.5 Nicht-kodierende RNAs und Schizophrenie

Bis jetzt wurde vor allem die Expression von microRNAs in postmortalem Gewebe schizophrener Probanden untersucht. Es sind einige Korrelationen zwischen verändert exprimierten microRNAs und Schizophrenie publiziert worden (Einzelheiten: [8]): Mehrfach repliziert ist die erhöhte Expression der miR-15 family im frontalen Kortex [108].

Die Expression von lncRNAs bei Schizophrenie ist bislang nur wenig analysiert worden: Nur eine Studie untersuchte die lncRNA Goma fu im Hirngewebe schizophrener Probanden und fand eine veränderte Expression im Temporallappen [120]. Für weitere lncRNAs, wie DISC-2, Evf2 und BDNF-AS, sind zwar Assoziationen mit Schizophrenie publiziert [121], Untersuchungen über das Expressionsverhalten dieser lncRNAs im Gehirn schizophrener Probanden fehlen aber. Auf diesem Gebiet besteht also Forschungsbedarf, um die Rolle der lncRNAs bei Schizophrenie zu klären.

1.3 Fragestellung

Schizophrenie geht mit starken sozialen Einschränkungen, einem hohen Leidensdruck und einem langwierigen Krankheitsverlauf einher. Da die Ätiologie der Erkrankung bis heute weitgehend unbekannt ist, sind sowohl die diagnostischen Parameter als auch die therapeutischen Möglichkeiten beschränkt. Die vorliegende Arbeit stellt Untersuchungen in drei Bereichen an, von denen sich ätiologische Erkenntnisse erhofft werden.

Die gesamte Arbeit ist als Fall-Kontroll-Studie aufgebaut. Jede Gruppe umfasst sieben Probanden. Die schizophrenen Probanden leiden alle an einer Schizophrenie residualen Typs (DSM-IV: 295.60); die Probanden der Kontrollgruppe sind nach den Regeln des Häufigkeitsmatchings ausgewählt.

Die Arbeit basiert auf der Untersuchung postmortalen Hirngewebes aus den Brodmann-Arealen 10 und 17/18. Das Brodmann-Areal 10 gilt wegen zahlreich beobachteter pathologischer Veränderungen als äußerst relevant für die Pathogenese der Schizophrenie. In den Brodmann-Arealen 17/18 werden pathologische Veränderungen dagegen vorwiegend im Sinne einer „Posteriorisierung“ bei Patienten mit starken Symptomen und schlechter Prognose beschrieben.

Zu den beobachteten pathologischen Veränderungen bei Schizophrenie zählt die Volumenminderung einzelner Hirnareale. Diese könnte auf eine veränderte Anzahl der Neuronen und/oder der Gliazellen zurückzuführen sein. Deswegen untersucht die vorliegende Arbeit die Anzahl der neuronalen und glialen Zellkerne in den Brodmann-Arealen 10 und 17/18.

Die Bedeutung von Genetik und Umweltfaktoren für die Ätiologie der Erkrankung könnte auf Veränderungen im Epigenom zurückzuführen sein. Die vorliegende Arbeit untersucht zwei epigenetische Aspekte – die DNA-Methylierung und die nicht-kodierenden RNAs. Hierfür bildet die extrahierte DNA bzw. RNA aus den neuronalen und glialen Zellkernen der Brodmann-Areale 10 und 17/18 die Untersuchungsgrundlage.

1 Einleitung

Mit der vorliegenden Arbeit soll zum einen die Frage beantwortet werden, ob die epigenetische DNA-Methylierung in einem Teilbereich des FKBP5-Gens bei Schizophrenie verändert ist. Das Protein des FKBP5-Gens ist in die Stressregulation involviert; Publikationen weisen auf eine Korrelation zwischen einer verminderten DNA-Methylierung am FKBP5-Gen, Stress-induzierenden Umwelteinflüssen und dem Auftreten psychiatrischer Erkrankungen hin. Für die Erkrankung Schizophrenie ist diese Korrelation bislang nicht untersucht worden.

Zum anderen wird in der vorliegenden Arbeit die Expression von 90 ncRNAs bei Schizophrenie analysiert. Hiermit soll ein erster Überblick geschaffen werden, welche ncRNAs für Schizophrenie relevant sein könnten. Daran anknüpfend wird der Frage nachgegangen, mit welchen Merkmalen des schizophrenen Phänotyps die verändert exprimierte ncRNAs in Zusammenhang stehen könnten.

2 Material und Methoden

Die Reihenfolge, in der die Methoden im Folgenden vorgestellt werden, entspricht der Reihenfolge der Durchführung der Versuche. Um das Kapitel übersichtlich zu halten, sind die Bestellnummern der verwendeten Materialien und Geräte im Anhang dargestellt (vgl. Tabelle 5.1 und Tabelle 5.2).

2.1 Studienkollektiv und Probengewinnung

2.1.1 Studienkollektiv

Das Studienkollektiv setzte sich aus neun schizophrenen Probanden und neun Kontrollfällen zusammen (vgl. Tabelle 2.1). Für alle Probanden galten folgende Ausschlusskriterien: Neurologische, neuropathologische und neurodegenerative Erkrankungen, Entzündungsprozesse, Tumorerkrankungen, Blutungen und Infarkte im Gehirn, Alkohol- und Drogenabusus und Suizid.

Alle schizophrenen Probanden litten zu Lebzeiten an einer Schizophrenie residualen Typs (295.60 nach DSM-IV), die von erfahrenen Psychiatern diagnostiziert worden war. Alle Probanden zeigten demnach einen Monat lang eindeutig schizophrene Symptome, darunter Wahn, Halluzinationen, desorganisierte Sprechweise, katatonies Verhalten oder Negativsymptome, und mindestens eine Jahr andauernde Negativsymptome [14]. Hinsichtlich der therapeutischen Maßnahmen unterschieden sich die untersuchten schizophrenen Probanden. In der Tabelle 2.2 sind die wichtigsten Daten zum Krankheitsverlauf der schizophrenen Probanden zusammengefasst.

Tabelle 2.1: Charakteristika der Probanden

Fall	Alter ¹	Geschlecht	Todesursache	PMI ²
K1	77	W	unbekannt	10
K2	46	M	Herzinfarkt	unbekannt
K3	91	W	Herz-Lungen-Insuffizienz	16
K4	66	M	Herzinfarkt	16
K5	41	M	Herzinfarkt	7
K6	69	W	Lungenembolie	96
K7	57	M	Herzinfarkt	24
K8	63	M	Herzinfarkt	13
K9	79	M	Herzinfarkt	24
S1	51	M	Herzinfarkt	12
S2	64	W	Herzinfarkt	23
S3	63	W	Herzinfarkt	31
S4	51	M	Herzinfarkt	7
S5	81	M	Cor pulmonale	4
S6	71	M	Herzinfarkt	28
S7	73	M	Herzinfarkt	20
S8	43	M	Herzinfarkt	18
S9	77	W	Lungenembolie	32

K: Kontrollfall; S: Schizophrener Proband

¹: *erreichtes Lebensalter in Jahren*

W: Weiblich; M: Männlich

²: *PMI = Postmortem Intervall; alle Angaben in Stunden*

2 Material und Methoden

Tabelle 2.2: Krankheitsverlauf der schizophrenen Probanden

Fall	Diagnose ¹	Alter ²	Dauer ³	Medikation zum Todeszeitpunkt	Dauer ⁴	EKT ⁵	Krankenhaus ⁶
S1	295.60	23	28	Clozapin 500 mg	25	Nein	17
S2	295.60	24	41	Zotepin 150 mg, Olanzapin 10 mg	40	Ja	5
S3	295.60	24	40	Olanzapin 15 mg	30	Ja	30
S4	295.60	19	25	Flupenthixol 15 mg	25	Nein	20
S5	295.60	19	62	Haloperidol 4 mg, Prothipendyl 80 mg	50	Nein	48
S6	295.60	30	40	Haloperidol 32 mg, Pipamperon 40 mg	35	Nein	12
S7	295.60	30	43	Perphenazin 32 mg, Promethazin 150 mg	40	Nein	33
S8	295.60	20	22	Zuclopenthixol 40 mg, Valproat 1200 mg, Tiaprid 300 mg	20	Nein	13
S9	295.60	28	49	Clozapin 400 mg, Benperidol 25 mg, Chlorprothixen 150 mg	48	Ja	48

¹: nach DSM-4; ²: Alter bei Diagnosestellung; ³: Dauer der Krankheit in Jahren

⁴: Dauer der Medikation in Jahren; ⁵: EKT = Elektrokonvulsionstherapie; ⁶: Krankenhausaufenthaltsdauer in Jahren

2.1.2 Zielregion und Gewebegewinnung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde graues Kortexgewebe aus dem Brodmann-Areal 10 und aus den Brodmann-Arealen 17/18 untersucht. Das Gewebe der drei Hirnareale stammte aus der linken Hemisphäre.

Alle Gewebeproben wurden von Professor Dr. Andrea Schmitt (Klinik und Poliklinik für Psychiatrie und Psychotherapie der Universität München Innenstadt) zur Verfügung gestellt. Die Proben wurden entsprechend den Richtlinien der lokalen Ethikkommission verwendet und vor Einschluss in die Studie anonymisiert.

Eine Autorisierung zur Obduktion wurde von den Patienten zu Lebzeiten oder von hinterbliebenen Verwandten eingeholt. Nach einem Postmortem-Intervall (PMI) von bis zu 94 Stunden (vgl. Tabelle 2.1) wurden alle Patienten einem allgemeinmedizinischen Screening unterzogen und makroskopisch sowie mikroskopisch untersucht. Im Anschluss erfolgte die Sezierung in Hirnregionen und die Gewebeasservierung in flüssigem Stickstoff bei -160 °C. Das Gewebe wurde bis zur Verwendung bei -80 °C aufbewahrt.

2.1.3 Aufbau der Arbeit als Fall-Kontroll-Studie

Die vorliegende Arbeit ist als Fall-Kontroll-Studie aufgebaut. Die Kontrollgruppe wurde so ausgewählt, dass die Gruppe der Kontrollfälle durchschnittlich ein vergleichbares Alter und das gleiche Geschlechterverhältnis aufweist wie die Gruppe der schizophrenen Probanden (Häufigkeitsmatching).

Je Hirnareal wurden jeweils nur sieben Kontrollfälle und sieben schizophrene Probanden aus dem Studienkollektiv untersucht. Ursächlich war, dass von einigen Probanden nur Gewebe aus einer Region zur Verfügung stand. Im Brodmann-Areal 10 wurden die Kontrollfälle K1 bis K3 und K5 bis K8 sowie die schizophrenen Probanden S2, S3 und S5 bis S9 untersucht. In den Brodmann-Arealen 17/18 wurden die Kontrollfälle K3 bis K9 und die schizophrenen Probanden S1 bis S4 und S6 bis S8 analysiert.

2 Material und Methoden

In der Tabelle 2.3 sind sowohl das Durchschnittsalter als auch das Geschlechterverhältnis der untersuchten Kontrollfälle und schizophrenen Probanden in den Hirnregionen Brodmann-Areal 10 und Brodmann-Areale 17/18 dargestellt.

Tabelle 2.3: Durchschnittswerte in den untersuchten Regionen

Fall	Region	Alter (Jahre)*	Geschlechterverhältnis
Ø K	Brodmann-Areal 10	63,4 ± 16,1	4 M : 3 W
Ø S	Brodmann-Areal 10	67,4 ± 11,6	4 M : 3 W
Ø K	Brodmann-Areale 17/18	66,7 ± 14,7	5 M : 2 W
Ø S	Brodmann-Areale 17/18	59,4 ± 10,4	5 M : 2 W

Die Tabelle fasst das durchschnittliche Alter (Mittelwert mit Standardabweichung) sowie das Geschlechterverhältnis (W: Weiblich; M: Männlich) der Kontrollgruppe (K) und der schizophrenen Probanden (S) zusammen.*

2.2 Extraktion der neuronalen und glialen Zellkerne und Extraktion der DNA und RNA

2.2.1 Extraktion der neuronalen und glialen Zellkerne

Im ersten Arbeitsschritt wurden die neuronalen und glialen Zellkerne aus dem Kortexgewebe extrahiert. Die hier verwendete Methode der Zellkernextraktion folgt im Wesentlichen den Protokollen von Jiang et al. [122] und Iwamoto et al. [88]. Im Vergleich mit den erwähnten Protokollen wurden in der vorgelegten Arbeit kleine Abweichungen vorgenommen, die die Reinheit der Zellkerne verbessern sollten. Die Veränderungen basieren auf den Ergebnissen der noch nicht veröffentlichten Dissertation von Julia Vlcek (Zentrum für Neuropathologie und Prionforschung der Ludwig-Maximilians-Universität München).

Die Betreuung der methodischen Schritte am Durchflusszytometer übernahm Dr. Sebastian Bultmann (Biomedizinisches Zentrum der Ludwig-Maximilians-Universität München).

2.2.1.1 Puffer

Lysispuffer: 0,32 M Sucrose, 5 mM CaCl_2 , 3 mM $\text{Mg}(\text{Ac})_2$, 10 mM Tris-HCl (pH 8), 0,1 mM PMSF, 0,16 mM DTT, 0,1 % Igepal, 0,1 mM EDTA (alle: Merck), 1 x Protease Inhibitor Cocktail (Pic-Tablette) (Roche)

Zellkern-Separations-Puffer: 1,8 M Sucrose, 3 mM $\text{Mg}(\text{Ac})_2$, 10 mM Tris-HCl (pH 8), 0,1 mM PMSF, 0,16 mM DTT (alle: Merck), 1 x Protease Inhibitor Cocktail (Pic-Tablette) (Roche)

Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS): 2,7 mM KCl, 137 mM NaCl, 1,8 mM KH_2PO_4 , 10 mM Na_2HPO_4 (alle: Merck)

2 Material und Methoden

2.2.1.2 Zellkernextraktion aus dem Hirngewebe

Alle Arbeitsschritte zur Extraktion der Zellkerne aus dem kortikalen Hirngewebe erfolgten bei 0 - 4 °C.

Je Gewebeprobe wurden 2 x 400 mg Kortextgewebe präpariert und die Leptomeninx entfernt.

400 mg Kortextgewebe wurden in 7,5 ml Lysispuffer gelöst und mit Hilfe eines Dounce-Homogenisators [(Clearance: 0.07 bis 0.127 mm), (Kimble)] homogenisiert. Das entstandene Homogenisat wurde in Ultrazentrifugenröhrchen (Thermo Fisher Scientific) überführt. Unter das Gemisch von Homogenisat und Lysispuffer wurden 13,5 ml Zellkern-Separations-Puffer pipettiert.

Das Homogenisat wurde 60 Minuten bei 24.400 rpm und 4 °C in der Ultrazentrifuge mit einem Rotor (beide: Sorvall) zentrifugiert. Dies bewirkte eine Sedimentation der Zellkerne auf den Boden der Zentrifugenröhrchen. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand in den Zentrifugenröhrchen verworfen. Zum Kernpellet am Boden des Zentrifugenröhrchens wurden 2 ml PBS pipettiert. Nach einer 20-minütigen Inkubationszeit wurden die Zellkerne resuspendiert.

2.2.1.3 Zelltypspezifische Auftrennung der isolierten Zellkerne

Die Immunfluoreszenzfärbung erfolgte bei Raumtemperatur. Verwendet wurde der Antikörper Anti-NeuN (Mouse-anti-NeuN, Millipore). Anti-NeuN bindet an ein neuronenspezifisches Protein; nur Purkinjezellen, Mitralzellen und Fotorezeptorzellen werden nicht durch den Antikörper Anti-NeuN gefärbt [123].

Zu den resuspendierten Zellkernen wurden 4 µl des monoklonalen Antikörpers Anti-NeuN (1 mg/ml) pipettiert. Nach einer einstündigen Inkubation wurden 4 µl des sekundären Antikörpers (2 mg/ml) (Alexa Fluor 546 goat-anti-mouse, Invitrogen) und 2 µl des Fluoreszenzfarbstoffs DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol, Roth) zugefügt. Nach einer einstündigen Inkubation im Dunklen erfolgte eine 30-sekündige Zentrifugation bei 8.000 rpm. Der Überstand wurde entfernt und das Zellkernpellet mit 2 ml PBS resuspendiert. Anschließend wurden die Zellkerne im

Durchflusszytometer (Becton Dickinson Biosciences) analysiert und in neuronale und gliale Zellkerne aufgetrennt.

Das Durchflusszytometer bestimmt zur Separation der Zellkerne die Oberflächeneigenschaften und das Fluoreszenzsignal. Die Oberflächeneigenschaften werden durch das Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht ermittelt: Vom Durchflusszytometer wird die Ablenkung eines Laserstrahls durch die einzelnen Zellkerne am Analysepunkt gemessen. Die Ablenkung entlang der Lichtachse wird als Vorwärtsstreulicht bezeichnet und die Ablenkung im 90° Grad Winkel zum Lichtstrahl als Seitwärtsstreulicht. Die Lichtbrechung verändert sich mit der Zellkerngröße, der Zellkerndichte und der Oberflächenbeschaffenheit [124]. Die Bestimmung des Vorwärts- und Seitwärtsstreulichtes ermöglicht die gezielte Erkennung von Zellkernen, während andere Partikel auf diese Weise aussortiert werden (vgl. Abbildung 2.1 A). Die Auftrennung der Zellkerne in neuronale und gliale Zellkerne erfolgt anhand der Immunfluoreszenzfärbung. Ein positives DAPI-Signal zeigt intakte Zellkerne an, während Zellfragmente, die kein DAPI-Signal zeigen, vom Durchflusszytometer aussortiert werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden alle Zellkerne mit positivem Anti-NeuN-Signal und positivem DAPI-Signal zu den neuronalen Zellkernen gruppiert; alle Zellkerne mit negativem Anti-NeuN-Signal und positivem DAPI-Signal zählten zu den nicht-neuronalen Zellkernen. Da die nicht-neuronalen Zellkerne im Wesentlichen den Gliazellen zugeordnet werden, werden sie im Folgenden als „gliale Zellkerne“ bezeichnet.

Um eine möglichst hohe Reinheit zu erzielen, wurden nur Zellkerne, die eindeutig den neuronalen oder glialen Zellkernen zuzuordnen waren, für die weitere Analyse verwendet. Die Zuordnung (Gating) wurde manuell anhand des Histogramms für jeden Probandenfall einzeln vorgenommen (vgl. Abbildung 2.1 B). Alle Zellkerne ohne eindeutige Zuordnung wurden verworfen.

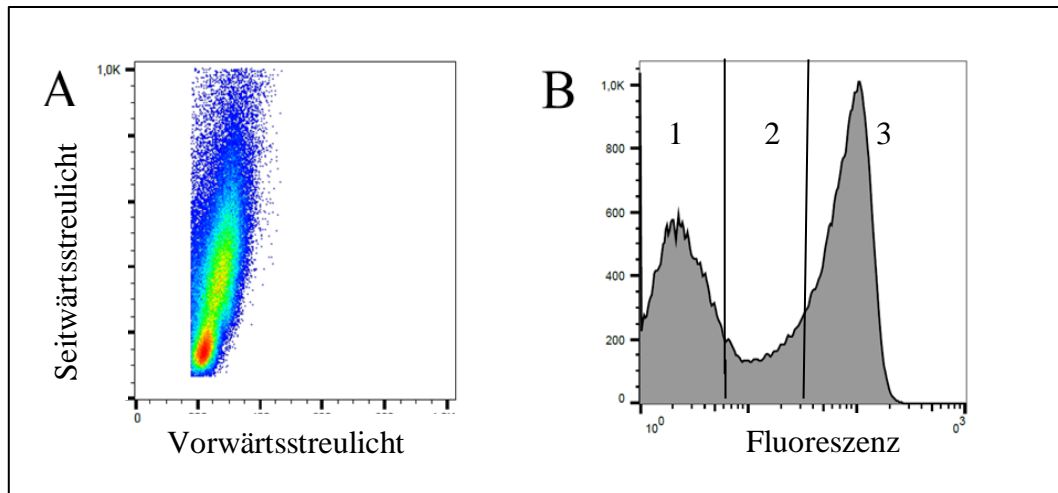


Abbildung 2.1: Graphen der Durchflusszytometrie

Dargestellt sind die Graphen der Durchflusszytometrie des Kontrollfalls 3 im Brodmann-Areal 10.

Graph A zeigt eine Lichtstreuungsanalyse als Punktdiagramm. Das Vorwärtsstreulicht – die Lichtablenkung entlang der Laserlichtachse – ist auf der X-Achse aufgetragen, das Seitwärtsstreulicht – die Lichtablenkung im 90 °-Winkel zur Laserlichtachse – auf der Y-Achse.

Graph B zeigt die Fluoreszenzfärbung als Histogramm und das Gating. Die Zellkerne im Bereich 1 wurden den nicht-neuronalen (glialen) Zellkernen zugeordnet und die Zellkerne im Bereich 3 den neuronalen Zellkernen. Die Zellkerne in Bereich 2 wurden verworfen, da keine eindeutig Zuordnung möglich war.

Im Anschluss an die Durchflusszytometrie wurde die Reinheit kontrolliert. Hierfür wurden die neuronalen und glialen Zellkerne nach der Durchflusszytometrie, getrennt voneinander, nochmal im Durchflusszytometer analysiert. Bei allen getesteten Proben wurden bei der zweiten Durchflusszytometrie mehr als 98% der Zellkerne den neuronalen bzw. den glialen Zellkernen zugeordnet. Somit musste keine Analyse wegen unzureichender Reinheit wiederholt werden.

2.2.1.4 Normalisierung und statistische Auswertung der Zellkerne

Um die gemessenen Zellkerne der einzelnen schizophrenen Probanden und Kontrollfälle vergleichen und statistisch auswerten zu können, wurden die gemessenen Zellkerne nach folgender Formel normalisiert:

$$\text{normalisierte Zellkerne} = \frac{\text{gemessene Zellkerne}}{\text{eingesetzte Kortexgewebemenge}} * 100 \text{ mg}$$

Zur statistischen Auswertung wurde der nicht-parametrische U-Test nach Mann-Whitney angewandt [125, 126] (vgl. hierzu auch Kapitel 3.3.1.4.2).

2.2.2 DNA-Extraktion aus den neuronalen und glialen Zellkernen

Aus den neuronalen und glialen Zellkernen, die aus 400 mg Kortexgewebe gewonnen wurden, wurde DNA extrahiert. Die DNA-Extraktion erfolgte mit dem DNA-Extraktionskit QIamp DNA Micro Kit (Qiagen) in dem alle verwendeten Puffer enthalten waren. Im Vergleich zum Herstellerprotokoll wurde DNA aus einer deutlich vergrößerten Ausgangsmenge extrahiert. Von daher musste das Herstellerprotokoll methodisch modifiziert werden. Die vorgenommenen Änderungen im Vergleich zum Herstellerprotokoll sind der noch nicht veröffentlichten Dissertation von Julia Vlcek (Zentrum für Neuropathologie und Prionforschung der Ludwig-Maximilians-Universität München) entnommen und werden im Folgenden beschrieben. Insgesamt wurden in der vorliegenden Arbeit größere Mengen der Puffer ATL und AL und der Proteinase K benötigt als im QIamp DNA Micro Kit (Qiagen) enthalten waren; deswegen wurden die beiden Puffer und die Proteinase zusätzlich bestellt.

Das Volumen der neuronalen und glialen Zellkerne wurde im Anschluss an die Durchflusszytometrie mit ATL-Puffer (Qiagen) verdoppelt. Je zugegebenem 1 µl ATL-Puffer wurden 0,016 µl Proteinase K (Qiagen) zugefügt. Die Mischung aus Zellkernen, ATL Puffer und Proteinase K inkubierte über Nacht bei 56 °C in einem Wasserbad.

2 Material und Methoden

Am Folgetag wurde das 1,1-fache Volumen des am Vortag zugegebenen ATL-Puffers an AL-Puffer (Qiagen) und 99,9 %-igem Ethanol zugegeben, vermischt und fünf Minuten inkubiert. Die gesamte Mischung aus Zellkernen, Pufferlösungen, Proteinase K und Ethanol wurde in 750-ml-Schritten auf eine Säule (QIamp DNA Micro Kit, Qiagen) pipettiert und der Durchfluss jeweils verworfen. Das weitere Vorgehen entsprach den Protokollangaben des QIamp DNA Micro Kits (Qiagen). Lediglich zur abschließenden Elution wurden, abweichend vom Herstellerprotokoll, 52 µl erwärmtes nukleasefreies Wasser (QIamp DNA Micro Kit, Qiagen) verwendet.

Die Proben wurden bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

2.2.3 RNA-Extraktion aus den neuronalen und glialen Zellkernen

Aus den neuronalen und glialen Zellkernen, die aus weiteren 400 mg Kortexgewebe gewonnen wurden, wurde RNA extrahiert. Die RNA-Extraktion erfolgte mit dem RNA-Extraktionskit miRNAeasy Micro Kit (Qiagen), das die verwendeten Puffer enthält. Im Vergleich zum Herstellerprotokoll wurde auch die RNA aus einer deutlich vergrößerten Ausgangsmenge extrahiert, weswegen das Herstellerprotokoll angepasst werden musste. Die Modifikationen sind der noch nicht veröffentlichten Dissertation von Julia Vlcek (Zentrum für Neuropathologie und Prionforschung der Ludwig-Maximilians-Universität München) entnommen und werden im Folgenden beschrieben.

Im Anschluss an die Durchflusszytometrie wurde das Volumen der Zellkerne mit dem QIAzol Lysis Reagents (Qiagen) verdoppelt und vermischt. Ein Fünftel des Gesamtvolumens wurde an Chloroform zugegeben. Nach einer dreiminütigen Inkubationszeit wurden die Zellkerne für 15 Minuten bei 9.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Durch die Zentrifugation bildeten sich drei Phasen; die oberste, farblose Phase enthielt die Zellkerne und wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, während die restliche Flüssigkeit verworfen wurde. Zum Volumen des Reaktionsgefäßes wurde das 1,5-fache Volumen an 99,9 %igem Ethanol zugegeben. Das komplette Volumen wurde mittels Vakuumpumpe durch eine Säule, die im miRNAeasy Micro Kit (Qiagen) enthalten ist, filtriert. Das weitere Vorgehen entsprach den Angaben des Herstellerprotokolls.

Bis zur weiteren Verwendung wurden die Proben bei -80 °C aufbewahrt.

2.2.4 DNA- und RNA-Konzentration

2.2.4.1 Messung der DNA- bzw. RNA-Konzentration

Die Konzentration der DNA bzw. RNA wurde mit einem Spektralphotometer (Nanodrop, Thermo Fisher Scientific) gemessen.

Das Spektralphotometer wurde zunächst mit der verwendeten Elutionslösung (DNA-Extraktion: Nukleasefreies Wasser; RNA-Extraktion: RNase-freies Wasser) geeicht. Zur Konzentrationsmessung wurde jeweils 1 µl der extrahierten DNA bzw. RNA eingesetzt.

Das Spektralphotometer misst den Absorptionsgrad der DNA bzw. RNA bei 260 nm und errechnet daraus über das Lambert-Beersche Gesetz die Konzentration der DNA bzw. RNA in ng/µl [127].

Bei der gemessenen RNA handelt es sich um eine Mischung unterschiedlicher RNA-Moleküle. Diese Mischung besteht aus messenger RNAs (mRNA) und nicht-kodierenden RNAs wie zum Beispiel ribosomalen RNAs (rRNA), transfer-RNAs (tRNA), microRNAs (miRNA) und langen nicht-kodierenden RNAs (lncRNAs).

2 Material und Methoden

2.2.4.2 Normalisierung der DNA- bzw. RNA-Konzentration

Um die DNA- und RNA-Mengen der schizophrenen Probanden und Kontrollfälle miteinander vergleichen zu können, wurde die DNA- bzw. RNA-Menge pro Zellkern mithilfe folgender Formel berechnet:

$$\text{normalisierte DNA/RNA-Menge} = \frac{\text{extrahierte DNA/RNA-Menge (pg)}}{\text{Menge der neuronalen/glialen Zellkerne}}$$

Zur statistischen Auswertung wurde wegen der geringen Stichprobengröße der nicht-parametrische U-Test nach Mann-Whitney angewandt [125, 126] (vgl. hierzu auch Kapitel 3.3.1.4.2).

2.2.5 Qualitätskontrolle der RNA

Die Qualität der RNA wurde mittels Mikrokapillarelektrophorese im Agilent-Bioanalyzer gemessen (Agilent Technologies) [128].

Zunächst wurden je Proband 10 mg Kortexgewebe aus den Brodmann-Arealen 10 und 17/18 präpariert. Daraus wurde mittels miRNeasy Micro Kit (Qiagen) gemäß den Protokollvorgaben RNA extrahiert. Anschließend wurde die Qualität der extrahierten RNA mit Hilfe des Agilent RNA 6000 Pico Kits und des Agilent-2100-Bioanalyzers (beide Agilent Technologies) bestimmt. Das Vorgehen entsprach den Protokollangaben des RNA 6000 Pico Kits. Abschließend erfolgte durch den Agilent-2100-Bioanalyzer automatisch die Berechnung der RIN-Werte (RIN = RNA Integrity Number) unter anderem auf der Grundlage der 28S- und 18S rRNA-Untereinheiten, sowie deren Verhältnis [128, 129].

Die RIN-Werte liegen auf einer Skala von 1 bis 10. Kleine RIN-Werte stehen für degenerierte RNA, große RIN-Werte für gut erhaltene RNA. Insgesamt gilt die RIN-Wert-Messung als sehr zuverlässige und nutzerunabhängige Messmethode der RNA-Qualität [128, 129].

2.3 DNA-Methylierung am Intron 7 des FKBP5-Gens

Zur Analyse der DNA-Methylierung wurde die extrahierte DNA aus den neuronalen und glialen Zellkernen der Brodmann-Areale 10 und 17/18 der schizophrenen Probanden und der Kontrollfälle eingesetzt. Die extrahierte DNA jedes Probanden wurde geteilt und für zwei unterschiedliche Untersuchungen verwendet:

Zum einen fand eine genomweite Sequenzierung mit genomweiter Analyse der DNA-Methylierung an der Universität Saarbrücken statt. Die Auswertung der Daten wird am Zentrum für Neuropathologie und Prionforschung der Ludwig-Maximilians-Universität München durchgeführt, ist aber noch nicht abgeschlossen.

Zum anderen wurde in der vorliegenden Arbeit die DNA-Methylierung speziell am FKBP5-Genabschnitt untersucht. Hierfür wurden die Methoden Bisulfitkonvertierung, Polymerase-Ketten-Reaktion und Sanger-Sequenzierung eingesetzt.

2.3.1 Bisulfitkonvertierung

Die Methode der Bisulfitkonvertierung wird verwendet, um nach der Sanger-Sequenzierung (siehe unten) methylierte Cytosin-Basen von nicht-methylierten Cytosin-Basen unterscheiden zu können: Methylierte Cytosin-Basen (5mC) reagieren nicht mit Bisulfit und bleiben in der DNA-Sequenz als Cytosin-Base erhalten. Nicht-methylierte Cytosin-Basen (C) werden durch die Bisulfitbehandlung in eine Uracil-Base umgewandelt, die in der DNA-Sequenz einer Thymin-Base (T) entspricht (vgl. Abbildung 2.2).

Zur Bisulfitkonvertierung wurde das EpiTect Fast Kit (Qiagen) verwendet. Das Vorgehen entsprach dem Protokoll für Standard-DNA-Konzentrationen. Je Probe wurden 150 ng DNA eingesetzt.

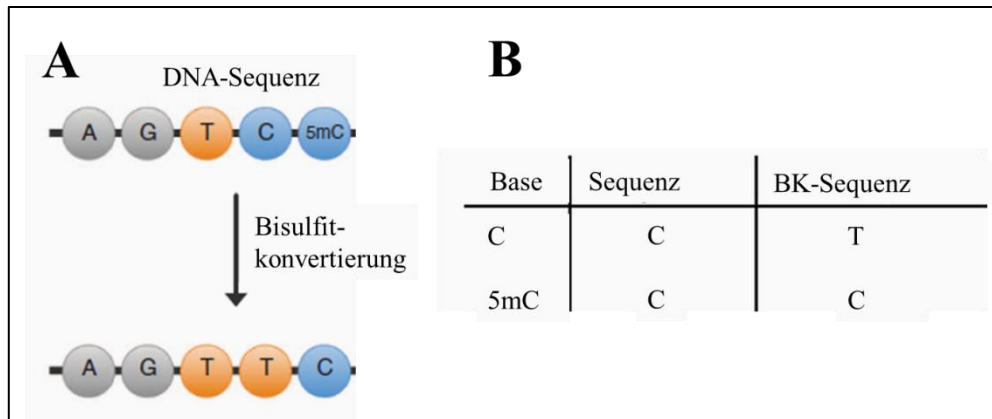


Abbildung 2.2: Prinzip der Bisulfitkonvertierung [130]

Abbildung A zeigt einen DNA-Abschnitt vor und nach der Bisulfitkonvertierung (BK). Die Abbildung B fasst das Prinzip der BK schematisch zusammen.

2.3.2 Amplifizierung des zweiten GRE des Introns 7 im FKBP5-Gen

Im nächsten Schritt wurde der zu untersuchende DNA-Abschnitt, das zweite GRE (Glucocorticoid-Response-Element) im Intron 7 des FKBP5-Gens, mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) nach Mullis amplifiziert [131, 132].

Die benötigten Primer wurden von Janina Mielke (Zentrum für Neuropathologie und Prionforschung der Ludwig-Maximilians-Universität München) designiert (siehe Tabelle 2.4).

Tabelle 2.4: PCR-Primer

Primer	Sequenz
Vorwärtsprimer	GTTTAGTGGTTTTTCGAGGATTTGT
Rückwärtsprimer	ATACAACGAAAAAACTCCGTATTCT

Zur PCR wurde das Multiplex PCR Kit (Qiagen) verwendet: Der Reaktionsansatz setzte sich aus 12,5 µl Qiagen Multiplex PCR Master Mix (2 x), 2,5 µl Primer Mix, 7 µl Wasser und 3 µl DNA zusammen. Die PCR wurde im Mastercycler EP

Gradient (Eppendorf) durchgeführt. Die PCR-Zyklen sind in der Tabelle 2.5 aufgeführt.

Tabelle 2.5: PCR-Zyklen

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Aktivierung	95 °C	15 Min.	1
Denaturierung	94 °C	30 Sek.	} 48
Annealing	54 °C	1 Min.	
Extension	72 °C	2 Min.	
Finale Extension	72 °C	10 Min.	1

2.3.3 PCR-Kontrolle: Gelelektrophorese

Im Anschluss an die PCR wurde eine Erfolgskontrolle durchgeführt. Dazu wurden die PCR-Produkte auf ein Gel mit elektrischem Feld aufgetragen (= Gelelektrophorese). Im elektrischen Feld sollen die PCR-Produkte auf Grund ihrer negativen Ladung zum entgegengesetzten, positiven Pol des Gels wandern [75]. Um die Größe von PCR-Produkten bestimmen zu können, wurde zusätzlich über einen Marker eine Skalierung auf das Gel aufgebracht.

Zur Gelkontrolle wurde das Flash Gel System (Lonza) verwendet. Der systemeigene Farbstoff, 5 x Flash Gel Loading Dye (Lonza), wurde von der fünffachen Konzentration auf die zweifache Konzentration verdünnt: Hierfür wurde zunächst die 40 x Running Buffer Stock Solution (Serva) im Verhältnis von 1:40 mit destilliertem Wasser verdünnt; dadurch entstand ein 1 M Tris-Acetat-EDTA (TAE)-Puffer. Der TAE-Puffer wurde dem 5 x Flash Gel Loading Dye (Lonza) im Verhältnis 2,5:1 zugegeben, sodass ein 2 x Flash Gel Loading Dye entstand.

Zur Gel-Kontrolle wurden 1,5 µl des verdünnten Farbstoffs 2 x Flash Gel Loading Dye (Lonza) mit 1,5 µl eines PCR-Produkts vermischt und auf das Flash Gel (Lonza) aufgetragen. Neben den Proben wurde auch eine Leerkontrolle auf das Gel aufgetragen. Die Leerkontrolle setzte sich aus Farbstoff und Wasser statt des PCR-Produktes zusammen. Außerdem wurde 1 µl des systemeigenen Markers,

2 Material und Methoden

Flash-Gel DNA Marker (Lonza), aufgetragen. Dieser zeigte Banden bei 50 bp, 100 bp, 150 bp, 200 bp, 300 bp, 500 bp, 800 bp und 1500 bp. Das Flash Gel wurde gemäß den Herstellerangaben aktiviert. Der Gellauf erfolgte bei einer Spannung von 275 V und endete nach 2-7 Minuten, sobald der Marker aufgetrennt war. Das Ergebnis wurde fotodokumentiert; eine beispielhafte Fotografie ist in der Abbildung 2.3 dargestellt.

Die PCR-Produkte sollten nach einer erfolgreichen PCR die gleiche Höhe wie die Markerbande von 300 bp erreichen. Die PCR-Produkte sollten dem zweiten GRE am Intron 7 im FKBP5-Gen entsprechen und dieser Abschnitt hat eine bekannte Länge von 304 bp [100]. Außerdem durfte die Leerkontrolle keine Bande zeigen, da sie keine DNA enthielt. Sie dient zum Ausschluss von Kontaminationen.

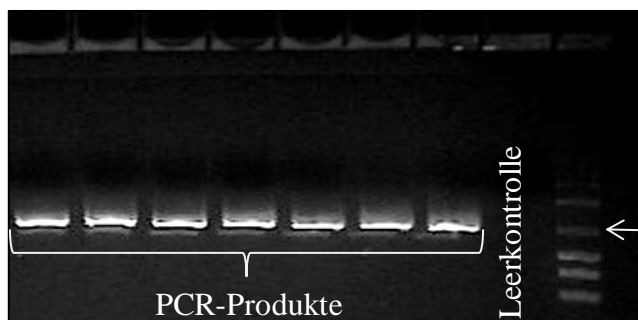


Abbildung 2.3: PCR-Kontrolle: Fotodokumentation

Dargestellt ist die Gelelektrophorese von sieben PCR-Produkten und einer Leerkontrolle. Die Markerbande von 300 bp war in diesem Versuch die Zielbande und ist in der Abbildung mit einem Pfeil markiert.

2.3.4 Aufreinigung

Als nächster Schritt folgte die Aufreinigung, die zur Entfernung überschüssiger PCR-Reagenzien dient.

Die Aufreinigung erfolgte mit dem DNA Clean & Concentrator Kit (Zymo Research). Hierfür wurden 20 µl PCR-Produkt und 100 µl DNA Binding Puffer (DNA Clean & Concentrator Kit, Zymo Research) eingesetzt. Das weitere Vorgehen ent-

sprach den Protokollangaben. Zur abschließenden Elution wurden 18 µl Elutions-Puffer (DNA Clean & Concentrator kit, Zymo Research) eingesetzt.

2.3.5 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung ermöglicht es die Basenabfolge einer DNA-Probe zu ermitteln. In dieser Arbeit wurde hierfür die Didesoxymethode nach Sanger (Sanger-Sequenzierung) [132, 133] angewandt; die Versuchsausführung oblag Janina Mielke (Zentrum für Neuropathologie und Prionforschung der Ludwig-Maximilians-Universität München).

2.3.5.1 Sequenzierreaktion

Die Sequenzierreaktion basiert auf der Synthese neuer DNA-Stränge an einem DNA-Einzelstrang. Zur DNA-Synthese von komplementären Strängen stehen bei der Methode nach Sanger neben den DNA-Basen (Nukleotidtriphosphate) auch chemisch modifizierte DNA-Basen (Didesoxynukleotide) in geringer Konzentration zur Verfügung. Der Einbau von Didesoxynukleotiden in einen komplementären DNA-Strang führt zum Abbruch der weiteren DNA-Synthese an diesem Strang. Da die Didesoxynukleotide zufällig und an verschiedenen Stellen in die DNA-Stränge eingebaut werden, entstehen unterschiedlich lange DNA-Moleküle. Die Didesoxynukleotide sind farbstoffmarkiert – jede der vier Basen (Adenin, Cytosin, Guanin und Thymin) mit einem eigenen Farbstoff. So kann später über die unterschiedliche Länge der DNA-Fragmente und die farbstoffmarkierte letzte Base die DNA-Basenabfolge bestimmt werden [132].

Es wurde nur ein DNA-Strang mittels Vorwärtsprimer analysiert. Die Sequenzierreaktion wurde mit dem BigDyeTerminator v3.1 Cycle Sequencingkit (Thermo Fisher Scientific) ausgeführt. Der Reaktionsansatz setzte sich aus 3,5 µl 5 x Sequenzierpuffer, 3,2 µl Primer, 1 µl BigDye, 10,3 µl Wasser und 2 µl PCR-Amplifikat zusammen. Die Sequenzierreaktion erfolgte im Mastercycler EP Gradient (Eppendorf); die Reaktionszyklen sind in Tabelle 2.6 dargestellt.

2 Material und Methoden

Tabelle 2.6: Zyklen der Sequenzierungsreaktion

Schritt	Zeit	Temperatur	Zyklen
Initiale Aktivierung	1 Min.	96 °C	1
Denaturierung	10 Sek.	96 °C	} 25
Annealing	5 Sek.	50 °C	
Extension	4 Min.	60 °C	

2.3.5.2 Aufreinigung

Der Sequenzierreaktion folgte eine Aufreinigung zur Entfernung von überschüssigen Reagenzien der Sequenzierreaktion.

Dafür wurde das DyeEx 2.0 Spin Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellerprotokolls verwendet. Im finalen Elutat befand sich die gereinigte Sequenzierreaktion.

2.3.5.3 Sequenzierung

Im letzten Schritt, der eigentlichen Sequenzierung, erfolgt die Ermittlung der Basenabfolge des Genabschnitts. Hierfür werden im Sequenzer zum einen die DNA-Stränge nach der unterschiedlichen Größe aufgetrennt. Zum anderen werden die Farbsignale der jeweils letzten Base, der unterschiedlich langen DNA-Fragmente, über einen Laser detektiert. Aus der Länge der DNA-Fragmente und deren Farbmarkierung kann die DNA-Basenabfolge bestimmt werden [132].

Methodisch wurden hierfür auf eine Probenplatte mit 96 Vertiefungen (Micro Amp Optical 96-Well Reaction Plate) 15 µl HiDi Formamid (beide: Applied Biosystems) und 5 µl gereinigte Sequenzierreaktion je Vertiefung pipettiert. Die Probenplatte wurde mit einer Septa (96-Well Plate Septa, Applied Biosystems) verschlossen und kurz zentrifugiert. Im Anschluss wurde die Probenplatte mit 30 µl 1 x Sequenzierpuffer (BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencingkit, Thermo Fisher Scientific) in den Sequenzer (Applied Biosystems) gegeben und die Kapillarelektrophorese gestartet.

Die Bestimmung der Basensequenz erfolgte am Sequenzer durch die Sequencing Analysis Software 6 (Applied Biosystems). Die Basenabfolge wurde als Sequenz-Chromatogramm dargestellt: Cytosin-Basen erscheinen blau, Thymin-Basen rot, Guanin-Basen schwarz und Adenin-Basen grün (vgl. Abbildung 2.4).

2.3.6 Auswertung der Sequenz-Chromatogramme

In der vorliegenden Arbeit sollte der Methylierungsstatus der drei Cytosin-Basen, die in den Cytosin-Guanin-Dinukleotiden (CpGs) der untersuchten Sequenz (zweites GRE im Intron 7 des FKBP5-Gens) vorkommen, bestimmt werden.

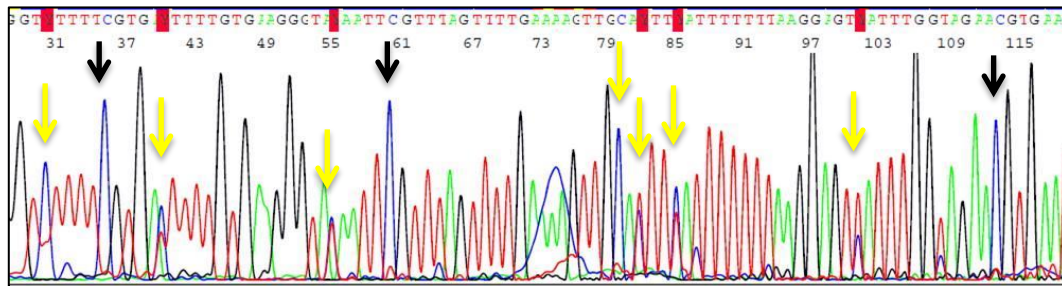
Hierfür wurde die ermittelte Sequenz (nach Bisulfit-Konvertierung und Sanger-Sequenzierung) mit der bekannten DNA-Sequenz des untersuchten zweiten GRE im Intron 7 des FKBP5-Gens verglichen (vgl. Abbildung 2.4). Dabei wurden nach der bekannten DNA-Sequenz die drei Cytosin-Basen, die innerhalb von CpGs liegen, im Sequenz-Chromatogramm aufgesucht. Erschien an einer Stelle im Sequenz-Chromatogramm eine Cytosin-Base, war die Cytosin-Base der untersuchten DNA-Ausgangssequenz methyliert (methylierte Cytosin-Basen werden durch die Bisulfitbehandlung nicht in Thymin umgewandelt). Erschien im Sequenz-Chromatogramm eine Thymin-Base, war die Cytosin-Base in der untersuchten DNA-Ausgangssequenz nicht methyliert.

2 Material und Methoden

A:

5'->
GGCCTCTT**CG**TGACTCCTGTGAAGGGTACAAT**CG**TT**CAG**CTCTGAAAA
GCTGCACCCCACTCCCCCAAGGAGCCACTTGGCAGAA**CG**TGAACC
-> 3'

B:



C:

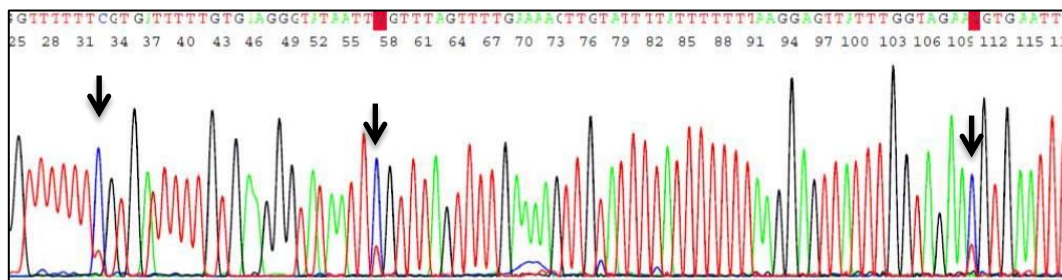


Abbildung 2.4: Sequenz des untersuchten FKBP5-Genabschnitts

Abgebildet ist die DNA-Sequenz des zweiten GRE im Intron 7 des FKBP5-Gens (A) und die entsprechenden Ausschnitte aus den Sequenz-Chromatogrammen des Kontrollfalls 1 (B und C). Die Chromatogramme zeigen die ermittelte DNA-Sequenz aus den neuronalen Zellkernen (B) und glialen Zellkernen (C) des Brodmann-Areals 10. Die drei Cytosin-Basen der CpG-Dinukleotide sind mit einem schwarzen Pfeil markiert. Außerhalb von CpGs gemessene Cytosin-Basen sind mit gelben Pfeilen markiert.

In den Sequenz-Chromatogrammen zeigten sich an einigen Stellen Überlagerungen zwischen dem blauen Peak der Cytosin-Base und dem roten Peak der Thymin-Base.

Für die Auswertung der Sequenz-Chromatogramme wurden daher Kriterien aufgestellt, die anhand der Abbildung 3.2 verdeutlicht werden. Eindeutige blaue Peaks im Sequenz-Chromatogramm standen für die Base Cytosin und damit für methylierte Cytosin-Basen in der Ausgangssequenz (grüner Pfeil). Blaue Peaks wurden auch dann als Cytosin-Base gewertet, wenn sie genau so groß oder um bis zu 10% kleiner als der gleichzeitig auftretende rote Peak waren (blaue Pfeile). Kleinere blaue Peaks wurden als Thymin-Base gewertet (rote Pfeile); sie stehen damit für nicht-methylierte Cytosin-Basen in der Ausgangssequenz.

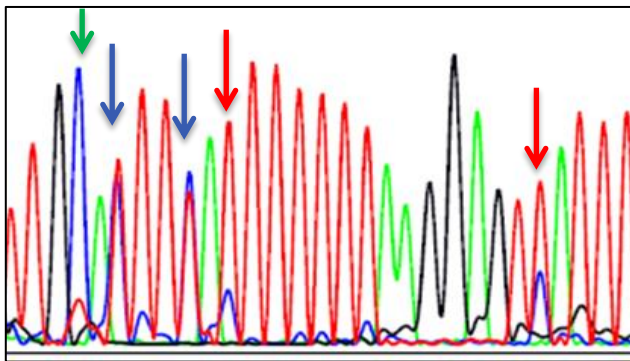


Abbildung 2.5: Auswertungskriterien

Abgebildet ist ein Auszug aus dem Sequenz-Chromatogramm der DNA-Sequenz des zweiten GRE im Intron 7 des FKBP5-Gens. Die dargestellte DNA-Sequenz stammt aus den neuronalen Zellkernen der Brodmann-Areale 17/18 vom Kontrollfall 1.

2.4 Expressionsanalyse von 90 ncRNAs

Die vorliegende Arbeit untersuchte die Expression von 90 nicht-kodierenden RNAs (ncRNA). Die Grundlage bildete die RNA, die aus den neuronalen und glialen Zellkernen aus den Brodmann-Arealen 10 und 17/18 der Kontrollfälle und der schizophrenen Probanden extrahiert wurde. Die Expression wurde mit Hilfe der Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) am Light Cycler (Roche) ermittelt.

2.4.1 Reverse Transkription

Die Reverse Transkription ist die Übersetzung eines RNA-Strangs in einen komplementären DNA-Strang (cDNA).

Die Reverse Transkription erfolgte nach den Protokollangaben des LncProfiler qPCR Array Kits (BioCat). Die Menge der eingesetzten RNA betrug bei allen Proben 50 ng.

2.4.2 Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion

Die cDNA wurde durch eine Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion vervielfältigt. Als Fluoreszenzfarbstoff wurde in dieser Arbeit Sybr Green I (Bioline) verwendet, der an doppelsträngige DNA bindet. Sybr Green I wird in jedem Amplifizierungszyklus der RT-PCR in die DNA eingebaut, sodass das Fluoreszenzsignal parallel zur Zunahme der cDNA mit jedem Zyklus stärker wird.

Vor Beginn der RT-PCR wurde aus 875 µl Sybr Green, 865 µl Nuklease-freiem Wasser (LncProfiler qPCR Array Kits, BioCat) und 20 µl cDNA eine Mischung erstellt. Die Mischung wurde auf eine RT-PCR Platte (96 well Frame Star Plate, 4titude) mit 96 Vertiefungen zu je 15 µl pro Vertiefung aufgetragen.

Als Primer wurden die systemeigenen, vordesignten und vorvalidierten Primer aus dem LncProfiler qPCR Array Kit (BioCat) verwendet. Diese waren auf einer Primer-Platte aufgetragen (vgl. Tabelle 2.8). Die Primer-Platte wurde mit 44 µl Nuklease-freiem Wasser pro Vertiefung resuspendiert. Im Anschluss wurde 1 µl jedes Primers auf die entsprechende Vertiefung in der RT-PCR-Platte (4titude)

übertragen. Mit jeder RT-PCR wurden 95 unterschiedliche ncRNAs eines Probanden analysiert, also 95 verschiedene Primer verwendet. In die letzte Vertiefung wurde Wasser statt eines Primers pipettiert (Leerkontrolle); die Leerkontrolle sollte in der RT-PCR keine Amplifizierung zeigen. Ein Amplifizierungssignal der Leerkontrolle wäre ein Hinweis auf eine Kontamination. Kontaminationen kamen bei keiner durchgeführten RT-PCR vor.

Die RT-PCR-Platte wurde mit einer selbstadhäsiven Klarsichtfolie (96 well Frame Star Plate, 4titude) verklebt und 1 Minute bei 1200 rpm zentrifugiert (Zentrifuge, Eppendorf). Danach wurde die RT-PCR im Light Cycler (Roche) mit den Einstellungen aus Tabelle 2.7 gestartet.

Tabelle 2.7: Einstellungen des Light Cyclers

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Carry-over-Verdau	50 °C	2 Min.	1
Polymeraseaktivierung	95 °C	2 Min.	1
Denaturierung	95 °C	5 Sek.	} 45
Annealing	60 °C	30 Sek.	
Elongation	60 °C	30 Sek.	
Abkühlung	40 °C		1

2.4.3 Auswertung der generierten ncRNA Daten

Vom Light Cycler wurde für jede der 95 ncRNAs eines Probanden eine Fluoreszenz-Amplifizierungskurve aufgezeichnet. Die Auswertung der generierten Fluoreszenz-Amplifizierungskurven stellte einen Schwerpunkt der Arbeit dar und wird deswegen im Ergebnisteil präsentiert (vgl. Kapitel 3.3.1).

Tabelle 2.8: Vordesignte, vorvalidierte Primer

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	21A	7SK	7SL	Air	AK023948	Alpha 280	Alpha 250	ANRIL	anti-NOS2A	anitPeg11	BACE1AS	BC200
B	CAR Intergenic	DHFR upstream	Dio3os	DISC2	DLG2AS	E2F4 antisense	EgoA	EGO B	Emx2os	Evf1 and EVF2	GASS	Gomafu
C	H19	H19 anti-sense	H19 upstream	HAR1A	HAR1B	HOTAIR	HOTAIRM1	HOTTIP	Hoxa11as	HOXA3as	HOXA6as	HULC
D	IGF2AS	IPW	Jpx	Kcnq1ot1	KRAS P1	L1PA16	p21	RoR	SFMBT2	VLDLR	LOC 285194	LUST
E	Malat1	mascRNA	MEG3	MEG9	MER11C	ncR-uPAR	NDM29	NEAT1	Nespas	NRON	NTT	p53mRNA
F	PCGEM1	PR anti-sense	PRINS	PSF inhibiting	PTENP1	RNCR3	SAF	SCA8	snaR	SNHG1	SNHG3	SNHG4
G	SNHG5	SNHG6	Sox2ot	SRA	ST7OT	TEA ncRNAs	Tmevpg	TncRNA	Tsix	TUG1	UCA1	UM9-5
H	WT1-AS	Xist	Y-RNA-1	Zeb2NAT	Zfas1	Zfhx2as	18S rRNA	RNU43	GAPDH	LAMIN A/C	U6	Kontrolle

Darstellung der Primer-Platte des LncProfiler qPCR Array Kits.

3 Ergebnisse

3.1 Durchflusszytometrie und DNA- und RNA-Extraktion

3.1.1 Anzahl der neuronalen und glialen Zellkerne bei Schizophrenie

Die vorliegende Arbeit analysiert die Anzahl der neuronalen und glialen Zellkerne in den Brodmann-Arealen 10 und 17/18, um potentielle Veränderungen in der Anzahl dieser Zellkerne bei Schizophrenie zu ermitteln.

Die Zellkerne wurden aus den Brodmann-Arealen 10 und 17/18 der schizophrenen Probanden und der Kontrollfälle mit der Methode der Durchflusszytometrie, unter Verwendung des Antikörpers Anti-NeuN, extrahiert. Um die gemessene Anzahl der Zellkerne vergleichen zu können, wurde die Zellkernmenge pro 100 mg eingesetztem Gewebe berechnet. Die gemessene sowie die normalisierte Anzahl der neuronalen bzw. glialen Zellkerne sind je Proband in der Tabelle 5.3 aufgeführt.

Die normalisierten Kernzahlen, die durchschnittlich in den untersuchten Hirnarealen und Zelltypen gemessen wurden, sind in der nachstehenden Tabelle 3.1 zusammengefasst.

Tabelle 3.1: Anzahl der neuronalen und glialen Zellkerne

Region	Zelltyp	Anzahl der Zellkerne (Mio./100 mg)*		Statistik p-Wert
		Kontrollgruppe	Schizophrene Probanden	
BA 10	NeuN +	0,47 ± 0,24	0,45 ± 0,19	0,902
BA 17/18	NeuN +	0,73 ± 0,20	0,71 ± 0,25	0,902
BA 10	NeuN -	0,42 ± 0,16	0,25 ± 0,05	0,098
BA 17/18	NeuN -	0,34 ± 0,12	0,24 ± 0,08	0,098

Die Tabelle stellt die durchschnittliche Anzahl der normalisierten, neuronalen (NeuN +) und glialen (NeuN -) Zellkerne in den Brodmann-Arealen 10 (BA 10) und 17/18 (BA 17/18) dar und gibt das Ergebnis der statistischen Berechnung (U-Test von Mann-Whitney) wieder.

** Mittelwerte mit Standardabweichung (STABW.N Funktion in Excel)*

Die Untersuchung der vorliegenden Arbeit ergibt in der Kontrollgruppe pro Milligramm Kortexgewebe im Brodmann-Areal 10 durchschnittlich 4.700 neuronale und 4.200 gliale Zellkerne, in den Brodmann-Arealen 17/18 durchschnittlich 7.300 neuronale und 3.400 gliale Zellkerne. In der Gruppe der schizophrenen Probanden zeigt die vorliegende Arbeit im Brodmann-Areal 10 durchschnittlich 4.500 neuronale und 2.500 gliale Zellkerne, in den Brodmann-Arealen 17/18 7.100 neuronale und 2.400 gliale Zellkerne pro Milligramm Kortexgewebe.

Das Verhältnis der neuronalen zu den glialen Zellkernen (N:G) liegt in der Kontrollgruppe im Brodmann-Areal 10 bei 1,1 und in den Brodmann-Arealen 17/18 bei 2,1. In der Gruppe der schizophrenen Probanden liegt das N:G im Brodmann-Areal 10 bei 1,8 und in den Brodmann-Arealen 17/18 bei 3,0.

Insgesamt zeigt die vorliegende Arbeit, dass sich die Anzahl der neuronalen Zellkerne in den untersuchten Hirnregionen zwischen der Gruppe der schizophrenen Probanden und der Kontrollgruppe auf einem vergleichbaren Niveau befindet (vgl. Abbildung 3.1 und Tabelle 3.1). Allerdings scheint die Anzahl der glialen Zellkerne bei Schizophrenie in beiden Hirnarealen vermindert zu sein (vgl. Abbildung 3.1). So lässt sich auch die Divergenz zwischen dem N:G der Kontrollgruppe und dem N:G der schizophrenen Probanden vor allem auf die unterschiedliche Anzahl der Gliazellkerne zurückführen. Obwohl die verminderte Anzahl der Gliazelle in dieser Arbeit nicht statistisch signifikant ist (vgl. Tabelle 3.1), kann sie als Trend zur Abnahme der Gliazellkerne bei Schizophrenie gedeutet werden.

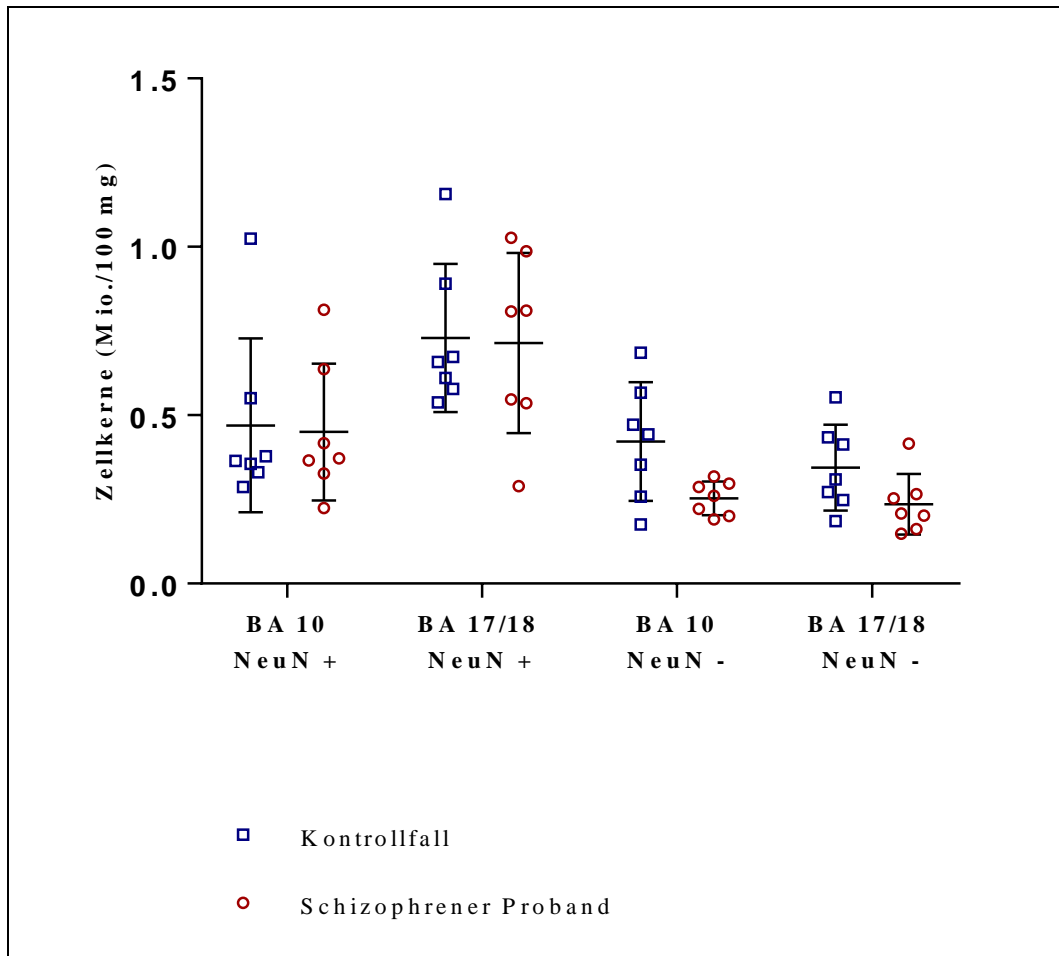


Abbildung 3.1: Verteilung der normalisierten Zellkerne

In der Abbildung sind die normalisierten Zellkerne (Y-Achse: Mio./100 mg Kortexgewebe) je untersuchter Hirnregionen und Zelltyp (X-Achse) dargestellt. Die horizontalen Linien geben die Mittelwerte, die vertikalen Linien die Standardabweichungen an. Die normalisierten Kernzahlen, die der Graphik zugrunde liegen, sind im Anhang in der Tabelle 5.3 zu finden.

3.1.2 DNA- und RNA-Menge

Neben der Analyse der Zellkerne befasst sich die vorliegende Arbeit mit der gemessenen DNA- bzw. RNA-Menge pro Zellkern. Hierfür wurde aus der Hälfte der neuronalen bzw. glialen Zellkerne mit validierten Aufbereitungsmethoden der Firma Qiagen DNA und aus der anderen Hälfte RNA extrahiert.

Die Messung hat pro Zellkern durchschnittlich $1,09 \pm 0,5$ pg DNA und $0,59 \pm 0,40$ pg RNA ergeben (vgl. Tabelle 5.4 bzw. Tabelle 5.5).

Eine Zelle enthält durchschnittlich 6 pg DNA und 10-30 pg RNA [134], wenn die Menge der Nukleinsäuren unter optimalen Bedingungen gemessen wird. Da die DNA zum größten Teil im Zellkern lokalisiert ist, ist der Wert von 6 pg DNA pro Zelle auch der Referenzwert für die Messungen in dieser Arbeit. Die RNAs hingegen sind nur zu ungefähr 14 % im Zellkern lokalisiert [134]. Daraus folgt, dass der Referenzwert für die Messungen dieser Arbeit in etwa zwischen 1,4 und 4,2 pg liegt. Das Verhältnis von DNA zu RNA im Zellkern liegt bei 2:1 [134].

Insgesamt zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit einen deutlichen Verlust der DNA und der RNA im Vergleich zu den Referenzwerten. Eine Ursache könnte sein, dass das untersuchte Gewebe lange gelagert und für mehrere Studien aufgetaut und wieder eingefroren wurde. Dies ist dem Seltenheitswerts des verwendeten Gewebes geschuldet. Studien zeigen, dass sich lange und unterbrochene Lagerung von postmortalem Gewebe negativ auf die extrahierte Menge an Nukleinsäuren auswirkt [135]. Des Weiteren könnten methodische Probleme bei der Extraktion der Nukleinsäuren ursächlich für den Verlust der Nukleinsäuren im untersuchten Gewebe sein. Beispielsweise führt eine unvollständige Zelllyse zur verminderten Extraktion von Nukleinsäuren [135].

3.1.3 Qualitätskontrolle der RNA

Die Qualität der RNA wurde mittels RIN-Wert-Messung kontrolliert. Die Skala der RIN-Werte reicht von 1 bis 10. Der RIN-Wert 1 steht für vollständig degradierte RNA, während der RIN-Wert 10 für völlig intakte RNA steht [128, 129].

In der vorliegenden Arbeit liegt der durchschnittlich gemessene RIN-Wert bei 3,4 (vgl. Tabelle 5.6).

Das Kapitel 3.3.1.2.1 befasst sich näher mit den RIN-Werten und deren Einfluss auf die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit.

3.2 DNA-Methylierung am Intron 7 des FKBP5-Gens

Der zweite Teil der vorliegenden Arbeit beschäftigt sich mit der DNA-Methylierung am zweiten Glucocorticoid-Response-Element (GRE) im Intron 7 des FKBP5-Gens. Im Mittelpunkt steht dabei die Frage, ob sich die Methylierung der drei Cytosin-Basen, die in diesem Abschnitt in Cytosin-Guanin-Dinukleotiden (CpGs) vorkommen, zwischen den schizophrenen Probanden und der Kontrollgruppe unterscheidet. Die inhaltliche Basis für diese Untersuchung leitet sich von den Ergebnissen der Studie von Klengel et al. zum FKBP5-Gen ab (vgl. Kapitel 1.2.2) [100].

Zur Untersuchung der Methylierung am zweiten GRE im Intron 7 des FKBP5-Gens wurden Bisulfitkonvertierung und Sanger-Sequenzierung angewandt.

3.2.1 Ergebnis der Auswertung

Die Auswertung der Sequenz-Chromatogramme gibt keinen Anhaltspunkt dafür, dass die Methylierung des untersuchten Abschnitts bei Schizophrenie abweichen könnte: Sowohl in der Gruppe der schizophrenen Probanden als auch in der Kontrollgruppe sind die drei Cytosin-Basen, die in den CpGs des untersuchten FKBP5-Genabschnitts vorkommen, methyliert (vgl. Tabellen 5.7-5.10).

In den neuronalen Zellkernen erweisen sich außerdem weitere Cytosin-Basen, außerhalb der drei CpGs, als methyliert. In den glialen Zellkernen sind nur einzelne Cytosin-Basen, außerhalb von CpGs, methyliert (vgl. Abbildung 2.4). Diese zelltypspezifischen Beobachtungen treten unabhängig davon auf, ob die DNA-Sequenz von einem Kontrollfall oder von einem schizophrenen Probanden stammt.

Beispielhaft sind in der Tabelle 3.2 die Auswertungsergebnisse eines Kontrollfalls und eines schizophrenen Probanden in den unterschiedlichen Hirnregionen und Zelltypen gegenübergestellt.

3 Ergebnisse

Tabelle 3.2: Auswertung der Sequenz-Chromatogramme

GGCTCTTCGTGACTCCTGTGAAGGGTACAATCCGTTTCAGCTCTGAAAAGCTGCACCCCACTCCCCAAGGAGCCACTTGGCAGAACTGTAACC

A: Kontrollfall 3

Region	Zelltyp	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
10	NeuN +	-	m	-	m	m	-	-	m	-	m	-	-	-	-	m	m	-	-	m	-	-	-	-	-	-	-	m	-	-	m	-	-
17/18	NeuN +	-	m	-	m	m	-	-	m	-	m	-	-	-	-	m	m	-	-	m	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	m	-	-
10	NeuN -	-	-	-	m	-	-	-	-	-	m	-	-	-	-	m	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	m	-	-
17/18	NeuN -	-	-	-	m	-	-	-	-	-	m	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	m	-	-

B: Schizophrener Proband 2

Region	Zelltyp	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
10	NeuN +	-	m	-	m	m	-	-	m	-	m	-	-	-	-	m	m	-	-	m	-	-	-	-	-	-	-	m	-	-	m	-	-
17/18	NeuN +	-	m	-	m	m	-	-	m	-	m	-	-	-	-	m	m	-	-	m	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	m	-	-
10	NeuN -	-	-	-	m	-	-	-	-	-	m	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	m	-	-
17/18	NeuN -	-	-	-	m	-	-	-	-	-	m	-	-	-	-	m	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	m	-	-

Dargestellt ist der Methylierungsstatus (m= methyliert; - = nicht-methyliert) der Cytosin-Basen in den neuronalen (NeuN +) und glialen (NeuN -) Zellkernen der Brodmann-Areal 10 (10) und 17/18 (17/18). Die drei CpGs sind hellblau unterlegt.

3.2.2 Datenqualität

Um die Qualität von Sequenz-Chromatogrammen zu bestimmen, wird die Signalintensität gemessen. Die Signalintensität soll bei Messungen mit optimaler Sensitivität und geringem Hintergrundrauschen zwischen 500 und 2000 liegen [136]. Die durchschnittlichen Signalintensitäten der Sequenz-Chromatogramme dieser Arbeit liegen bei 200. Dies macht sich auch als Hintergrundrauschen bemerkbar (vgl. Abbildung 3.2; lila Pfeil). Die verringerte Signalintensität und das Hintergrundrauschen führen wahrscheinlich zu einer Verminderung der Sensitivität der Messungen [136].

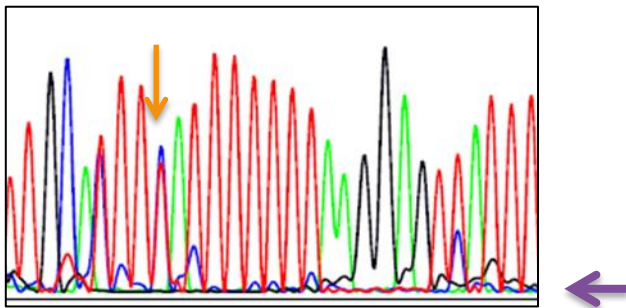


Abbildung 3.2: Auszug aus einem Sequenz-Chromatogramm

Abgebildet ist ein Auszug aus einem Sequenz-Chromatogramm. Die DNA-Sequenz stammt aus den neuronalen Zellkernen der Brodmann-Areale 17/18 von Kontrollfall 1. Der lila Pfeil zeigt das Hintergrundrauschen an, der orange Pfeil heterozygote Doppelpeaks.

Wie bereits im Kapitel 2.3.6 angesprochen, zeigen sich an einigen Stellen in den Sequenz-Chromatogrammen heterozygote Doppelpeaks an Cytosin-Basen (vgl. Abbildung 3.2; oranger Pfeil). Solche heterozygote Peaks könnten Hinweise auf SNPs geben [136]. Da aber in der vorliegenden Arbeit nur ein DNA-Strang untersucht wurde, sind SNPs als Ursache so gut wie auszuschließen. Wahrscheinlich sind die heterozygoten Doppelpeaks ein Anzeichen für eine unvollständige Bisulfitkonvertierung (siehe unten).

3 Ergebnisse

Auch die Messung von Cytosin-Methylierungen außerhalb von CpGs könnte einer unvollständigen Bisulfitkonvertierung geschuldet sein. In der Literatur wird das Vorkommen von Cytosin-Methylierungen außerhalb von CpGs als sehr seltenes Ereignis beschrieben [137, 138].

Eine unvollständige Bisulfitkonvertierung bedeutet, dass nicht-methylierte Cytosin-Basen durch die Behandlung mit Bisulfit nicht zu Thymin konvertieren, wie es bei einer korrekten Bisulfitkonvertierung der Fall wäre. In solchen Fällen werden nicht-methylierte Cytosin-Basen mit der Sanger-Sequenzierung als Cytosin-Basen dargestellt. Die Sanger-Sequenzierung ergibt dann fälschlicherweise zu viele Methylierungen [137, 138]. Ursächlich könnten eine ungenügende DNA-Qualität, eine unvollständige Auftrennung der DNA-Stränge, zu hohe eingesetzte DNA-Konzentrationen, eine ungünstige Sekundärstruktur der DNA, eine kontaminierte Bisulfit-Lösung oder Probleme bei der PCR sein [137].

In der vorliegenden Arbeit werden in der DNA aus neuronalen Zellkernen deutlich mehr Cytosin-Methylierungen außerhalb von CpGs gemessen als in der DNA aus glialen Zellkernen. Da Bisulfitkonvertierung und PCR für beide Zellkernarten zeitgleich erfolgten, scheint die Ursache nicht bei den technischen und chemischen Komponenten von Bisulfitkonvertierung und PCR zu liegen. Möglicherweise reagiert die DNA-Struktur von Neuronen und Gliazellen unterschiedlich sensibel auf äußere Einflüsse (z.B. Zeitraum der Gewebelagerung), sodass hierin die Ursache für die Unterschiede zwischen den Zellarten liegen könnte.

Auf Grund der dargestellten Problematik sind die Ergebnisse der vorgelegten Studie ohne Replikation nicht verwertbar. Eine Wiederholung des Versuchs im Rahmen dieser Arbeit war nicht möglich, weil das postmortale Gewebe aufgebraucht war. Wie im Material und Methodenteil beschrieben, wurde eine genomweite Sequenzierung mit Methylierungsanalyse durchgeführt, deren Auswertung noch aussteht. Die Auswertung dieser Daten soll zur Beantwortung der eingangs gestellten Frage, ob die Methylierung im zweiten GRE des Introns 7 am FKBP5-Gen bei Schizophrenie verändert ist, in Abgleich mit den Daten der vorliegenden Arbeit, beitragen.

3.3 Expressionsanalyse von 90 nicht-kodierenden RNAs

Der Fokus des dritten Kapitels liegt auf der Expressionsanalyse von 90 nicht-kodierenden RNAs (ncRNAs). Die Fragestellung konzentriert sich darauf, wie sich die Expression der ncRNAs in der Gruppe der schizophrenen Probanden gegenüber der Expression in der Kontrollgruppe verhält.

Die Grundlage bildet die extrahierte RNA aus den neuronalen und glialen Zellkernen der Brodmann-Areale 10 und 17/18. Die Expression der 90 ncRNAs wurde durch die Echtzeit-PCR (RT-PCR) analysiert. Da die Entwicklung einer Auswertungsstrategie einen Schwerpunkt der Arbeit darstellt, wird die Datenauswertung im Ergebnisteil präsentiert.

3.3.1 Auswertung

3.3.1.1 Ermittlung der Kalkulationseinheit „Cq-Wert“

In der RT-PCR wird die Ausgangsmenge der zu untersuchenden ncRNA vervielfältigt. Unter idealen Bedingungen verdoppelt sich die Ausgangsmenge der ncRNA mit jedem RT-PCR-Zyklus [131]. Die Zunahme der ncRNA-Menge mit jedem RT-PCR Zyklus wird durch das Fluoreszenzsignal verbildlicht, das als Amplifizierungskurve mit den Zyklen auf der X-Achse und dem Fluoreszenzsignal auf der Y-Achse dargestellt wird. Der Verlauf der Amplifizierungskurve lässt sich in vier Phasen einteilen: In der ersten Phase wird die Ausgangsmenge der ncRNA exponentiell vervielfältigt; die gemessene Fluoreszenz liegt jedoch unterhalb der Hintergrundfluoreszenz. In der zweiten Phase verläuft die Amplifizierung ebenfalls exponentiell, die gemessene Fluoreszenz übersteigt aber die Hintergrundfluoreszenz. In der dritten Phase verläuft die Amplifizierung der ncRNA nur mehr linear, während in der vierten Phase die Amplifizierung fast zum Erliegen kommt und die Amplifizierungskurve als Plateau verläuft [139-141]. Die vier Phasen der RT-PCR werden in der Abbildung 3.3 veranschaulicht [139].

3 Ergebnisse

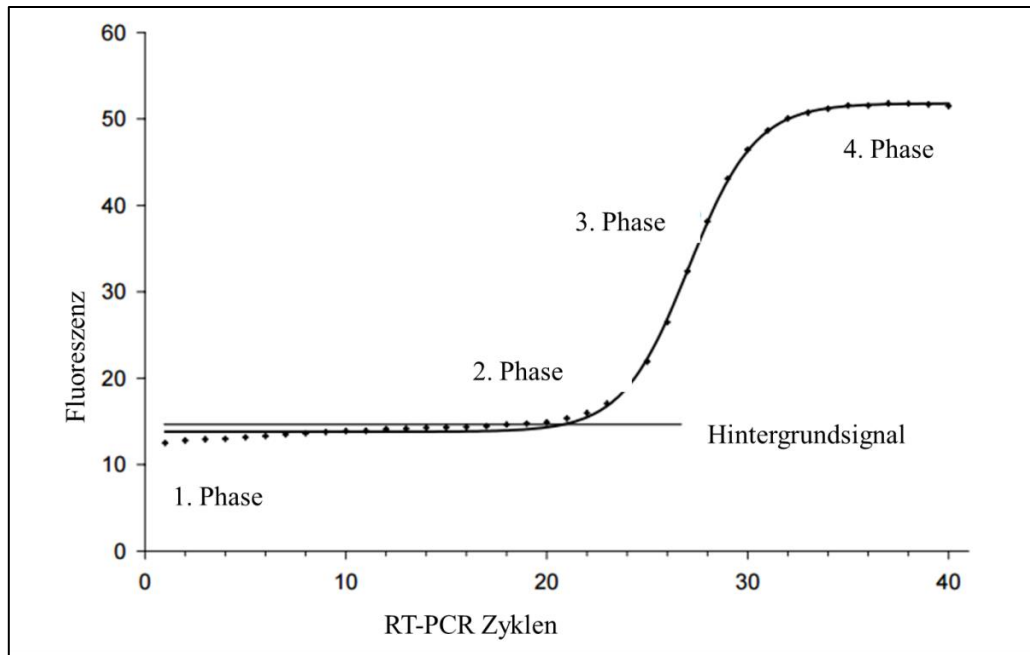


Abbildung 3.3: Vier Phasen einer RT-PCR

Die Abbildung zeigt die vier Phasen einer Amplifizierungskurve; das Fluoreszenzsignal liegt auf der Y-Achse und die RT-PCR-Zyklen liegen auf der X-Achse [139].

Weil die Fluoreszenz nur in der zweiten Phase der RT-PCR exponentiell steigt und oberhalb der Hintergrundfluoreszenz liegt, besteht nur in dieser Phase eine direkte Proportionalität zwischen der Ausgangsmenge der ncRNA und der gemessenen Menge der ncRNA. Da es das Ziel der RT-PCR ist eine Aussage über die Ausgangsmenge der ncRNA zu treffen, kann zur Auswertung der Amplifizierungskurve nur die zweite Phase der RT-PCR genutzt werden [139-141]. Folglich wird zur Auswertung ein Wert in der zweiten Phase definiert, der bei allen zu untersuchenden Probanden und ncRNAs bestimmt werden kann. Dieser Wert wird in der vorliegenden Arbeit, gemäß den von Bustin et al. aufgestellten Richtlinien für Publikationen über RT-PCRs, als Cq-Wert (Cq = quantification cycle) bezeichnet [142]. Andere Publikationen nutzen synonym die Begriffe Ct-Wert (Ct = cycle threshold) oder Cp-Wert (Cp = crossing point) [142].

3.3.1.1.1 Berechnung des Cq-Werts

Zur Bestimmung des Cq-Werts können verschiedene Methoden angewandt werden [143, 144]. Bei einigen Methoden entspricht der Cq-Wert dem RT-PCR-Zyklus, bei dem die Amplifizierungskurve einen festgelegten Schwellenwert überschreitet (z.B. Fit Point Methode oder Threshold Cycle Methode) [139, 140]. Der Nachteil dieser Methoden liegt darin, dass viele Festlegungen, wie der Schwellenwert oder die Hintergrundfluoreszenz, manuell vorgenommen werden müssen [140, 145].

In der vorliegenden Arbeit wurde zur Cq-Wert-Bestimmung die Second Derivative Maximum-Methode (SDM-Methode) gewählt. Der grundlegende Gedanke der SDM-Methode ist, dass der Kurvenverlauf ein guter und stabiler Marker für die Ausgangskonzentration der ncRNA ist [144]. Bei der SDM-Methode wird der Cq-Wert aus dem Maximum der 2. Ableitung der Amplifizierungskurve berechnet. Das Maximum der zweiten Ableitung liegt dort, wo die Amplifizierungskurve die größte Beschleunigung aufweist. Der Cq-Wert liegt also bei der SDM-Methode am Übergang der zweiten, exponentiellen Phase der Amplifizierungskurve zur dritten, linearen Phase [139, 144, 146]. Dieser Zusammenhang zwischen dem Maximum der zweiten Ableitung und dem Cq-Wert wird in der Abbildung 3.4 veranschaulicht [147]. Die Berechnung nach der SDM-Methode erfolgt automatisch und die Korrektur der Cq-Werte um das Hintergrundsignal ist integriert. Die SDM-Methode ist für die Light Cycler Software von Roche urheberrechtlich geschützt [144].

Der in der zweiten Phase der RT-PCR bestimmte Cq-Wert ist indirekt proportional zur Ausgangsmenge der ncRNA. Je stärker ein Gen in der Zelle exprimiert ist, desto früher entsteht ein deutliches Fluoreszenzsignal. Der ermittelte Cq-Wert ist dann niedrig [148].

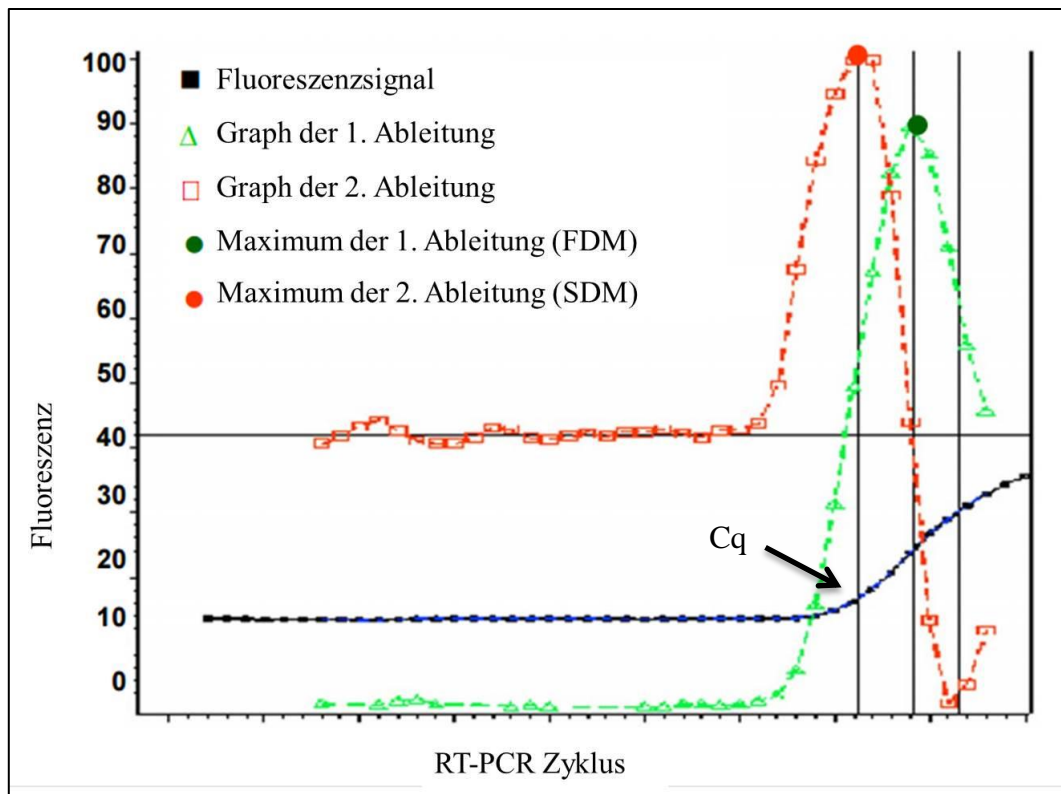


Abbildung 3.4: Cq-Wert Bestimmung nach der SDM-Methode

In der Abbildung sind eine Amplifizierungskurve (blau) sowie deren erste (grün) und zweite Ableitung (rot) mit dem Fluoreszenzsignal auf der Y-Achse und den RT-PCR-Zyklen auf der X-Achse dargestellt. Der Pfeil zeigt auf der Amplifizierungskurve den Punkt an, an dem die zweite Ableitung ihr Maximum erreicht. Dieser Punkt wird in der vorliegenden Arbeit zur Bestimmung des Cq-Wertes verwendet [147].

3.3.1.1.2 Umgang mit nicht berechneten Cq-Werten

In der vorliegenden Arbeit wurde die RT-PCR nach 40 Zyklen abgebrochen, weil nach 40 Zyklen die RT-PCR-Effizienz stark absinkt [142]. Wenn es während der 40 RT-PCR-Zyklen zu keiner nennenswerten Amplifizierung der ncRNA kommt, wird vom Light Cycler für die betreffende ncRNA kein Cq-Wert berechnet.

Die Expressionsanalyse kann nicht durchgeführt werden, wenn Cq-Werte einzelner ncRNAs fehlen [149]. Deswegen wurden in dieser Arbeit fehlende Cq-Werte durch konstruierte Cq-Werte ersetzt. Zu Grunde liegt die Hypothese, dass der Cq-

Wert nicht gemessen wurde, weil die RT-PCR nach 40 Zyklen abgebrochen wurde; hätte die RT-PCR mehr als 40 Zyklen gehabt, wäre es zu einer Amplifizierung und somit zu einer Berechnung des Cq-Werts gekommen. Ein fehlender Cq-Wert wird bei diesem Lösungsansatz als letzter möglicher Cq-Wert plus ein RT-PCR-Zyklus konstruiert [149]. Der konstruierte Cq-Wert beträgt in dieser Arbeit 41.

Der Light Cycler kann Cq-Werte auch dann nicht berechnen, wenn das Hintergrundsignal zu stark ist oder enorm schwankt [144]. Fälle mit starkem Hintergrundsignal sind anhand des Light Cycler Ergebnisses nicht von Fällen zu unterscheiden, bei denen wegen des RT-PCR Abbruchs kein Cq-Wert berechnet wurde. Also wird, wie oben ausgeführt, auch für Fälle mit starkem Hintergrundsignal fälschlicherweise der Cq-Wert 41 konstruiert. Solche Proben mit falsch konstruierten Cq-Werten führen unausweichlich zu Irrtümern in der Analyse und Interpretation der Daten.

In der vorliegenden Arbeit wurde angenommen, dass die Bestimmung der Cq-Werte wegen eines ungünstigen Hintergrundsignals fehlerhaft ist, wenn bei mehr als 35 % aller ncRNAs eines Probanden kein Cq-Wert vom Light Cycler berechnet werden konnte. Solche Fälle wurden von der weiteren Expressionsanalyse ausgeschlossen. Im Brodmann-Areal 10 waren in den neuronalen Zellkernen der Fall S7 und in den glialen Zellkernen die Fälle K7, K8 und S3 betroffen. In den Brodmann-Arealen 17/18 wurden in den neuronalen Zellkernen die Fälle K7 und S1, in den glialen Zellkernen die Fälle S2 und S8 eliminiert.

Die Tabellen mit den gemessenen und konstruierten Cq-Werten sind im Anhang aufgeführt (vgl. Tabellen 5.11-5.14).

3.3.1.2 Quantifizierungsstrategien

Der Cq-Wert wird von Störfaktoren biologischer und technischer Art beeinflusst. Deswegen kann der Cq-Wert nicht ohne weiteres genutzt werden, um eine Aussage über die Menge einer ncRNA im Ausgangsgewebe zu treffen [150]. Der Cq-Wert ist vielmehr eine Kalkulationseinheit für die weitere Expressionsanalyse [140].

Zur Analyse der ncRNA-Expression stehen zwei Quantifizierungsstrategien zur Auswahl – die Methode der absoluten Quantifizierung und die Methode der relativen Quantifizierung.

Bei der absoluten Quantifizierung wird die absolute Anzahl der Startkopien oder -konzentrationen der untersuchten ncRNA angegeben [151]. Dafür muss eine Standardkurve erstellt werden. Hierin liegt auch der Nachteil der absoluten Quantifizierung, denn das Erstellen einer Standardkurve beinhaltet per se eine Vielzahl von möglichen Fehlerquellen. Potentielle Fehlerquellen liegen zum einen im biologischen Ausgangsmaterial, das für die Standardkurve verwendet wird, und zum anderen darin, dass die Standardkurve unabhängig von den Amplifizierungskurven der anderen Proben erstellt wird; methodische Fehler können also nicht ausgeglichen werden [152].

Diese Fehlerquellen entfallen bei der relativen Quantifizierung, die als „Goldstandard“ gilt, und in der vorliegenden Arbeit als Auswertungsmethode gewählt wurde [152]. Relative Quantifizierung bedeutet, dass die Expression jeder zu untersuchenden ncRNA eines Probanden in Bezug auf die Expression einer Referenz-RNA des selben Probanden (internes Referenzgen) angegeben wird [148]. Die relative Quantifizierung bewirkt, dass Schwankungen zwischen verschiedenen Proben ausgeglichen werden (Normalisierung) [145]. Schwankungen entstehen unausweichlich und können biologische, methodische oder technische Ursachen haben. Biologische Ursachen sind beispielsweise Unterschiede in der Probenqualität wie unterschiedliche postmortale Bedingungen oder unterschiedliche RNA-Integritäten (vgl. Kapitel 3.3.1.2.1). Potentielle methodische Schwankungen können während der Probenbearbeitung durch unterschiedlich eingesetzte RNA-Mengen und nicht beeinflussbare Pipettierfehler verursacht werden. Technisch

bedingte Schwankungen entstehen zum Beispiel durch unterschiedliche Effizienzen bei der RNA-Extraktion, bei der reversen Transkription oder der Amplifizierung [129, 142, 153, 154].

Da von solchen Schwankungen die zu untersuchenden ncRNAs und die internen Referenzgene eines Probanden gleichermaßen betroffen sind, werden die Schwankungen durch die Normalisierung ausgeglichen [151].

3.3.1.2.1 Exkurs: Zusammenhang zwischen RIN-Werten und Cq-Werten

Von Fleige et al. wurde gezeigt, dass die RNA-Qualität die Cq-Werte der RT-PCR beeinflusst. Die RNA-Integrität wird durch die RIN-Werte angegeben, die sich auf einer Skala von 1 (degradierte RNA) bis 10 (intakte RNA) bewegen. Bei RNA mit kleineren RIN-Werten scheinen höhere Cq-Werte gemessen zu werden als bei RNA mit größeren RIN-Werten. Besonders deutlich scheint sich dieser Effekt bei RNA mit RIN-Werten, die kleiner als fünf sind, auszuwirken [129].

Fleige et al. zeigen, dass die Normalisierung der Cq-Werte den Einfluss der RNA-Qualität auf die Cq-Werte deutlich zu verringern scheint (vgl. Abbildung 3.5) [129]. Wenngleich der Einsatz von Proben mit verminderter RNA-Qualität die Aussagekraft der Ergebnisse mindert, ist es dennoch vertretbar, dass im Rahmen dieser Arbeit auch RNA mit ungünstigen RIN-Werten verwendet wurde (vgl. Tabelle 5.6).

3 Ergebnisse

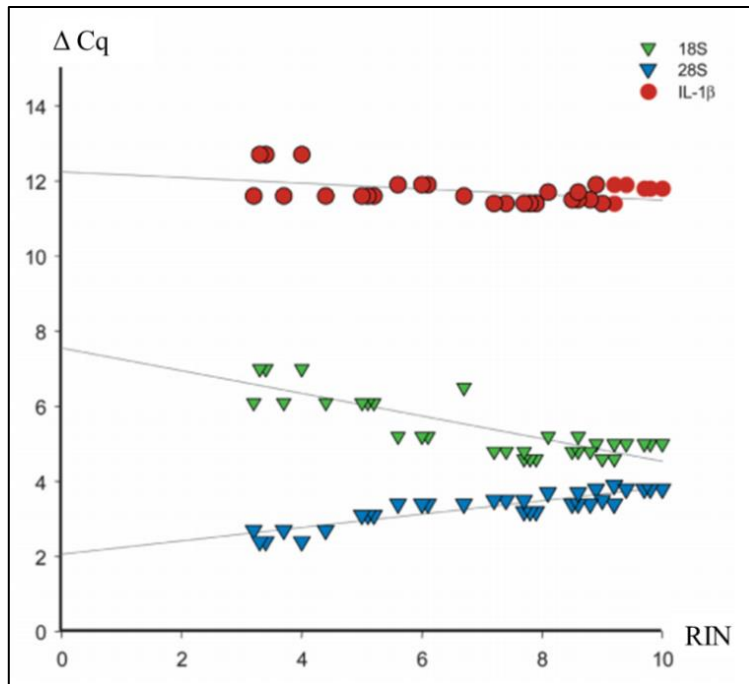


Abbildung 3.5: Normalisierte Cq-Werte in Abhängigkeit von den RIN-Werten

Die Abbildung aus der Arbeit von Fleige et al. [129] stellt eine Beziehung zwischen den normalisierten Cq-Werten (Y-Achse) und den gemessenen RIN-Werten (X-Achse) der einzelnen Proben her. Gemessen wurde diese Beziehung bei den drei Genen 18S, 28S, IL-1 β .

3.3.1.2.2 Auswahl der Referenzgene

Gene, die zur Normalisierung verwendet werden, werden als Referenzgene bezeichnet. Da es keine ubiquitären Referenzgene gibt, muss bei jedem Experiment getestet werden, welche Gene als Referenzgene im untersuchten Gewebe in Frage kommen. Die Literatur stellt an Referenzgene die Anforderungen, dass sie im untersuchten Gewebe konstant und stabil exprimiert sind [142, 153] und dass sie ein deutliches Amplifizierungssignal, das über das Hintergrundfluoreszenzsignal hinausgeht, zeigen [153]. Des Weiteren wird zur Normalisierung die Verwendung eines Mittelwerts aus mehreren Referenzgenen empfohlen [142, 153].

In der vorliegenden Arbeit sollen die Ergebnisse der ncRNA-Expression in unterschiedlichen Hirnregionen (Brodmann-Areale 10 und 17/18) und Zelltypen (neuronale und gliale Zellkerne) miteinander verglichen werden. Deswegen ist es not-

wendig, in den untersuchten Hirnregionen und Zelltypen jeweils dieselben Gene als Referenzgene zu verwenden.

Die Referenzgene, die diesen Anforderungen entsprechen, wurden mit dem Normfinder-Programm von Andersen et al. ausgewählt [153].

Mit dem Normfinder-Programm können fünf bis zehn Gene auf deren Eignung als Referenzgene getestet werden [153, 154]. Daher wurde zunächst eine Vorauswahl von zehn potentiellen Referenzgenen anhand einer Literaturrecherche getroffen [154]. Die Vorauswahl beinhaltete die Gene 18s rRNA, RNU43, GAPDH, LAMIN A/C und U6 snRNA. Diese fünf Gene werden in vielen Publikationen als Referenzgene verwendet [140, 145, 148] und auch vom verwendeten Kit (LncProfiler qPCR Array Kit, BioCat) als Referenzgene vorgeschlagen. Diese fünf Gene wurden zusätzlich zu den 90 ncRNAs, die untersucht werden sollten, analysiert. Außerdem wurden die fünf ncRNAs 7SK, LUST, HOXA6as, NDM29 und IGF2AS in die Vorauswahl aufgenommen. Die fünf ncRNAs wurden in einer Studie mit einem ähnlichen Studiendesign von Kraus et al. als potentielle Referenzgene im Gehirn ermittelt [109].

Die potentiellen Referenzgene wurden anschließend danach selektiert, ob sie bei allen untersuchten Probanden (Kontrollfälle und schizophrene Probanden) ein Fluoreszenzsignal zeigten, das oberhalb der Hintergrundfluoreszenz lag [153]. In der Folge wurden 18S rRNA, LAMIN A/C, IGF2AS und NDM29 aussortiert, weil sie bei mindestens einem schizophrenen Probanden oder Kontrollfall den konstruierten Cq-Wert von 41 zeigten.

Im Anschluss wurden mit Hilfe des Normfinder-Programms die Referenzgene auf die Stabilität ihrer Expression über alle Kontrollfälle und schizophrene Probanden, Hirnregionen (Brodmann-Areale 10 und 17/18) und Zelltypen (neuronale und gliale Zellkerne) getestet. Das Normfinder-Programm errechnet als Beurteilungskriterium den Stabilitätswert (siehe Kapitel 3.3.1.2.4). Je kleiner dieser Wert, desto stabiler ist ein Gen in allen untersuchten Proben exprimiert [153].

In der vorliegenden Arbeit wurden anhand der Normfinder-Analyse die drei Gene RNU43, GAPDH und U6 snRNA als Referenzgene ausgewählt. Aus den Cq-Werten der drei Referenzgene wurde ein Mittelwert gebildet. Die Stabilität des

3 Ergebnisse

Mittelwertes wurde im Normfinder in Gegenüberstellung mit den einzelnen potentiellen Referenzgenen getestet. Diese Testung sollte Sicherheit geben, die bestmögliche Referenz für die weitere Analyse zu verwenden (vgl. Tabelle 3.3).

3.3.1.2.3 Normalisierung

Rechnerisch wurde die Normalisierung wie folgt vorgenommen: Zunächst wurde der Mittelwert aus den drei ausgewählten Referenzgenen RNU43, GAPDH und U6 probandenspezifisch, also für jeden schizophrenen Probanden und jeden Kontrollfall, berechnet. Dieser probandenspezifische Mittelwert wurde von allen 90 gemessenen Cq-Werten des Probanden subtrahiert. Dies lässt sich in der folgenden Formel ausdrücken [148, 150]:

$$\Delta Cq_{ncRNA} = Cq_{ncRNA} - Cq_{\text{Mittelwert der Referenzgene}}$$

Tabelle 3.3: Stabilitätswerte der potentiellen Referenzgene nach Normfinder je Hirnregion und Zelltyp

Brodmann-Areal 10		Brodmann-Areale 17/18		Brodmann-Areal 10		Brodmann-Areale 17/18	
Neuronale Zellkerne		Neuronale Zellkerne		Gliale Zellkerne		Gliale Zellkerne	
Referenzgen	Sw	Referenzgen	Sw	Referenzgen	Sw	Referenzgen	Sw
MW	0,093	MW	0,176	MW	0,136	U6 snRNA	0,103
U6 snRNA	0,214	RNU43 *	0,258	U6 snRNA	0,212	MW	0,251
RNU43 *	0,214	U6 snRNA	0,421	GAPDH	0,273	RNU43 *	0,368
GAPDH	0,252	7SK	0,449	RNU43 *	0,286	GAPDH	0,376
LUST	0,272	GAPDH	0,488	7Sk	0,325	HOXA6as	0,407
7Sk	0,302	LUST	0,508	LUST	0,419	7SK	0,486
HOXA6as	0,337	HOXA6as	0,686	HOXA6as	0,550	LUST	0,613

Die potentiellen Referenzgene sind nach dem errechneten Stabilitätswert (Sw) aufsteigend geordnet. Der Mittelwert der Referenzgene RNU43, GAPDH und U6 snRNA (MW) erwies sich als bester Referenzwert über alle untersuchten Hirnregionen und Zelltypen.

** Name abgekürzt*

3 Ergebnisse

3.3.1.2.4 Exkurs: Normfinder

Das Normfinder-Programm basiert auf dem von Andersen et al. entwickelten „Model-based-approach to estimation of expression variance“ [153].

Für die Berechnung mit dem Normfinder-Algorithmus mussten die Cq-Werte zunächst in relative Konzentrationen, sogenannte Relative Quantities (RQ), umgewandelt werden. Hierfür wurde zunächst für jede ncRNA der jeweils kleinste gemessene Cq-Wert über alle Probanden bestimmt (Cq_{min}). Dann konnten alle Cq-Werte nach folgender Formel in einen RQ-Wert umgewandelt werden [154]:

$$RQ = \frac{1}{2^{(Cq_{min} - Cq_{Proband})}}$$

$Cq_{Proband}$ = Cq-Wert eines Probanden, der in ein RQ umgewandelt werden soll (der $Cq_{Proband}$ muss sich auf dieselbe ncRNA beziehen wie der Cq_{min})

Zusätzlich wurden die RQs jeweils mit einer Gruppenkennung entweder für die Kontrollgruppe oder für die Gruppe der schizophrenen Probanden versehen.

Durch den Normfinder-Algorithmus wird die Streuung der RQs innerhalb der Gruppe der schizophrenen Probanden bzw. der Kontrollfälle (Intragruppenvarianz) und zwischen der Gruppe der schizophrenen Probanden und der Kontrollgruppe (Intergruppenvarianz) berechnet. Sowohl die Intragruppenvarianz als auch die Intergruppenvarianz sollen bei einem guten Referenzgen möglichst klein sein. Im Vergleich zu anderen Berechnungsprogrammen zeichnet das Normfinderprogramm die besondere Berücksichtigung der Intergruppenvarianz aus. Diese soll verhindern, dass ein Referenzgen gewählt wird, das durch die Erkrankung reguliert wird [153].

Aus Intergruppenvarianz und Intragruppenvarianz wird durch das Normfinder-Programm der Stabilitätswert berechnet. Der Stabilitätswert ist die zentrale Größe im Normfinder-Programm, nach dem geeignete Referenzgene ausgewählt werden. Als bestes Referenzgen wird vom Normfinder-Programm das Gen mit dem geringsten Stabilitätswert vorgeschlagen, da es die günstigste gemessene Kombina-

tion aus Inter- und Intragruppenvarianz besitzt [153]. Außerdem gibt der Stabilitätswert als Zahlenwert an, welcher Fehler begangen wird, wenn das entsprechende Referenzgen zur Normalisierung verwendet wird [153].

3.3.1.3 Effizienzkorrektur

Die Cq-Werte werden in der exponentiellen Phase der RT-PCR bestimmt (vgl. Kapitel 3.3.1.1). Zur statistischen Berechnung müssen die normalisierten Cq-Werte folglich um die PCR-Effizienz in dieser exponentiellen Phase korrigiert werden; die Korrektur erfolgte nach folgender Formel [148, 150, 151]:

$$Expression = E^{-\Delta Cq}$$

$\Delta Cq = \text{normalisierte Cq-Werte}$

$E = \text{PCR-Effizienz}$

Durch das Minus-Zeichen im Exponenten der Formel wird der inverse Charakter der Cq-Werte aufgehoben. Ein niedriger berechneter Expressionswert bedeutet also eine niedrige relative Genexpression; ein hoher berechneter Expressionswert steht für eine hohe relative Genexpression [148].

Die Effizienz-korrigierten, normalisierten Cq-Werte werden als normalisierte, individuelle Expressionsdatenpunkte bezeichnet [148].

In der vorliegenden Arbeit wurden, wie auch bei Schmittgen et al. und Livak et al., optimale RT-PCR Bedingungen ($E = 2$) angenommen [148, 150]. Damit verzichtet die Arbeit auf eine Berechnung der tatsächlichen RT-PCR-Effizienz (Einzelheiten: [141, 151]), denn der Schwerpunkt liegt darauf, die Expression möglichst vieler ncRNAs bei Schizophrenie zu testen. So soll im Sinne des „initialen Screenings“ festgestellt werden [141], ob bzw. welche ncRNAs bei Schizophrenie ein interessantes Feld für weitere Forschung darstellen.

3 Ergebnisse

3.3.1.4 Statistik

Abschließend soll die Expression der 90 ncRNAs zwischen den schizophrenen Probanden und der Kontrollgruppe verglichen und auf statistisch signifikante Unterschiede überprüft werden.

3.3.1.4.1 Fold Change

Der Fold Change (FC) drückt aus, in welcher Gruppe (Kontrollgruppe oder Gruppe der schizophrenen Probanden) eine ncRNA stärker exprimiert ist. Zur Bestimmung des FC wird der Mittelwert aus den normalisierten, individuellen Expressionsdatenpunkten der schizophrenen Probanden mit dem Mittelwert der Kontrollfälle in Relation gesetzt [148].

$$FC = \frac{MW(Sz)}{MW(K)}$$

MW = Mittelwert der normalisierten Expressionsdatenpunkte

War ein FC kleiner als 1, wurde der negative Kehrwert berechnet [148]:

$$\frac{-1}{FC}$$

Ein negativer FC legt eine verringerte relative Expression der ncRNA bei Schizophrenie nahe. Ein positiver FC deutet auf eine stärkere Expression der ncRNA in der Gruppe der schizophrenen Probanden verglichen mit der Kontrollgruppe hin [150].

Die Höhe des FC-Werts lässt jedoch keine zuverlässige Aussage darüber zu, ob der Expressionsunterschied zwischen der Kontrollgruppe und der Gruppe der schizophrenen Probanden statistisch signifikant ist.

3.3.1.4.2 Mann-Whitney U-Test

Um die Expressionsunterschiede zwischen den Probandengruppen auf ihre Signifikanz zu testen, wird in der vorliegenden Arbeit der nicht-parametrische, zweiseitige Mann-Whitney U-Test (Abk.: U-Test) verwendet.

Der nicht-parametrische U-Test wurde gewählt, da die Stichprobengröße sehr klein ist [155] und eine Normalverteilung, die für parametrische Tests notwendig ist, nicht angenommen werden konnte [125, 155].

Folgende Testhypothesen wurden für den U-Test aufgestellt:

- Nullhypothese: Es gibt keinen Unterschied in der Expression der ncRNAs zwischen der Kontrollgruppe und der Gruppe der schizophrenen Probanden.
- Alternativhypothese: Die Expression der ncRNAs ist zwischen der Kontrollgruppe und der Gruppe der schizophrenen Probanden unterschiedlich.
- Signifikanzniveau: 5%

Der U-Test berücksichtigt im Gegensatz zum FC die Verteilung der normalisierten, individuellen Expressionsdatenpunkte. Daraus wird der p-Wert bestimmt ($p = \text{probabilité}$) [126, 155]. Der p-Wert gibt die Wahrscheinlichkeit an, mit der ein Ergebnis erzielt wird, das gleich wahrscheinlich oder unwahrscheinlicher ist als das Beobachtete [155, 156]. Bei p-Werten, die über dem Signifikanzniveau liegen ($> 0,05$), kann keine Aussage darüber getroffen werden, ob die Nullhypothese oder die Alternativhypothese zutrifft. Bei p-Werten unter dem Signifikanzniveau ($< 0,05$) gilt die Alternativhypothese als sehr wahrscheinlich [155].

Ein signifikanter U-Test bedeutet, dass der Unterschied in der Verteilung der individuellen Expressionsdatenpunkte zwischen den Probandengruppen sehr deutlich ausgefallen ist [126, 155]. Es gilt daher als unwahrscheinlich, dass der Expressionsunterschied zwischen den schizophrenen Probanden und der Kontrollgruppe nur dem Zufall geschuldet ist. Es wird dann von einem „statistisch signifikanten Expressionsunterschied“ einer ncRNA zwischen der Kontrollgruppe und der Gruppe der schizophrenen Probanden gesprochen [155].

3 Ergebnisse

Durch den zweiseitigen U-Test wird getestet, ob sich die Expression einer ncRNA zwischen der Kontrollgruppe und den schizophrenen Probanden unterscheidet. Die Alternativhypothese ist „ungerichtet“; das heißt, dass bei einer gültigen Alternativhypothese keine Angabe dazu gemacht werden kann, in welcher Probandengruppe die relative Expression niedriger oder höher ist [155]. Diese Entscheidung ist sowohl durch den FC als auch graphisch durch die Verteilung der normalisierten, individuellen Expressionsdatenpunkte in den beiden Probandengruppen möglich.

3.3.2 Resultate der Expressionsanalyse von 90 nicht-kodierenden RNAs

Die Ergebnisse der Expressionsanalyse aller 90 ncRNAs sind tabellarisch im Anhang aufgeführt (vgl. Tabellen 5.15 bis 5.18).

Im folgenden Fließtext werden ausgewählte ncRNAs vorgestellt. Alle Angaben zur Lokalisation von ncRNAs im Genom stützen sich auf die lncRNA-Datenbank [157] oder auf die Gendatenbank der Internet-Literaturdatenbank Pubmed.

3.3.2.1 NcRNAs mit statistisch signifikantem Expressionsunterschied zwischen den schizophrenen Probanden und der Kontrollgruppe

Die Expressionsanalyse von 90 ncRNAs weist bei 14 ncRNAs einen statistisch signifikanten Expressionsunterschied zwischen den schizophrenen Probanden und der Kontrollgruppe nach. Die 14 ncRNAs sind im Folgenden nach der Hirnregion und dem Zelltyp gruppiert, in der/dem der statistisch signifikante Unterschied in der relativen Expression der ncRNA gemessen wurde (vgl. Tabelle 3.4).

3 Ergebnisse

Tabelle 3.4: NcRNAs mit statistisch signifikantem Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und den schizophrenen Probanden

NcRNA	Region	Zelltyp	p-Wert	FC	Expression
Jpx	BA 10	NeuN +	0,022	2,56	S > K
p53 mRNA	BA 10	NeuN +	0,034	2,98	S > K
ST7OT	BA 10	NeuN +	0,034	1,15	S > K
LOC285194	BA 17/18	NeuN +	0,042	-2,97	S < K
RNCR3	BA 17/18	NeuN +	0,026	-7,54	S < K
TEA ncRNAs *	BA 17/18	NeuN +	0,042	-4,61	S < K
Malat1	BA 17/18	NeuN +	0,042	5,19	S > K
Har1B	BA 10	NeuN -	0,018	-2,60	S < K
IPW	BA 17/18	NeuN -	0,048	-1,83	S < K
Kcnq1ot1	BA 17/18	NeuN -	0,048	-6,67	S < K
masRNA	BA 17/18	NeuN -	0,048	-4,48	S < K
SNHG6	BA 17/18	NeuN -	0,030	-2,77	S < K
BACE1AS*	BA 17/18	NeuN -	0,030	1,95	S > K
DHFR **	BA 17/18	NeuN -	0,048	2,45	S > K

* family; ** upstream transcripts family

In der Tabelle sind die ncRNAs zusammengefasst, deren Expression sich zwischen der Kontrollgruppe (K) und der Gruppe der schizophrenen Probanden (S) statistisch signifikant unterscheidet. Dargestellt ist der p-Wert (U-Test von Mann-Whitney) und der Fold Change (FC) in der Hirnregion (BA 10: Brodmann-Areal 10; BA 17/18: Brodmann-Areale 17/18) und dem Zellkerntyp (NeuN +: neuronale Zellkerne; NeuN -: gliale Zellkerne), in der/dem der Expressionsunterschied vorliegt.

3.3.2.1.1 Expressionsunterschied der RNAs Jpx, ST7OT und p53 mRNA in den neuronalen Zellkernen des Brodmann-Areals 10

Die Expressionsanalyse von 90 ncRNAs in den neuronalen Zellkernen des Brodmann-Areals 10 kommt zu folgendem Ergebnis: Die Expression von drei RNAs weicht bei den schizophrenen Probanden statistisch signifikant von der Kontrollgruppe ab (vgl. Tabelle 3.4 und Tabelle 5.15).

Eine der drei RNAs ist die lncRNA Jpx. Die genetische Information von Jpx ist am X-Chromosom lokalisiert und liegt nahe der Information der ncRNA Xist. Dieser lokalen Beziehung trägt der für Jpx synonym gebrauchte Namen Enox („expressed neighbour of Xist“) Rechnung [158].

Zu den drei RNAs gehört auch ST7OT. Unter der Bezeichnung ST7OT werden vier lncRNAs zusammengefasst [159]. Der Name ST7OT setzt sich aus ST7, das für den Genlokus ST7 („suppressor of tumorigenicity“) steht, und OT („overlapping transcript“) zusammen. Die vier lncRNAs sind auf dem Chromosom 7 lokalisiert. ST7OT1 und ST7OT2 sind Antisense-Transkripte vom Genlokus ST7; die genetische Information für ST7OT3 und ST7OT4 liegt auf demselben DNA-Strang wie das Gen ST7 [118, 159].

Die dritte RNA ist p53 mRNA. Die genetische Information für p53 mRNA ist am Chromosom 17 lokalisiert. P53 mRNA gehört nicht zu den ncRNAs, weil p53 mRNA die mRNA ist, die zum Protein p53 translatiert wird. P53 mRNA wird im Rahmen dieser Arbeit untersucht, weil ihr in neuen Studien neben der Funktion als mRNA auch eine regulatorische Funktion für die Expression des Proteins p53 zugesprochen wurde [160].

Bei allen drei RNAs legen die positiven FC-Werte (vgl. Tabelle 3.4 und Tabelle 5.15) und die Einzelwertdiagramme eine erhöhte Expression bei Schizophrenie nahe (vgl. Einzelwertdiagramme: Jpx: Abbildung 3.6, ST7OT: Abbildung 5.1 p53mRNA: Abbildung 5.2).

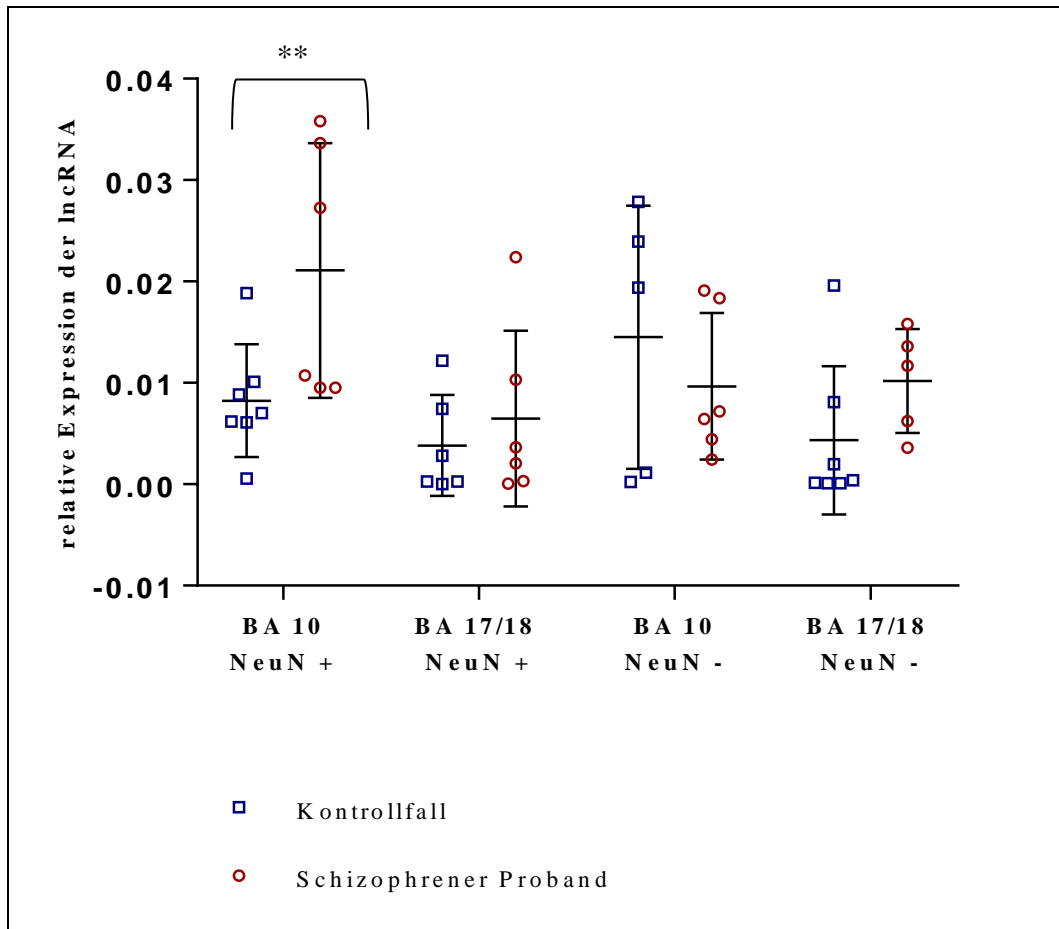


Abbildung 3.6: Einzelwertdiagramm der relativen Expression von Jpx

Darstellung der relativen Expression von Jpx (Y-Achse) in den untersuchten Hirnregionen und Zelltypen (X-Achse). Abgebildet sind die individuellen Expressionsdatenpunkte der einzelnen Probanden (blaue Vierecke: Kontrollfälle; rote Kreise: Schizophrene Probanden), die Mittelwerte (horizontale Linien) und die Standardabweichungen (vertikale Linien).

In den neuronalen Zellkernen des Brodmann-Areals 10 unterscheidet sich die relative Expression von Jpx zwischen den schizophrenen Probanden und der Kontrollgruppe statistisch signifikant (**).

3.3.2.1.2 Expressionsunterschied der ncRNAs LOC285194, RNCR3, TEA ncRNAs (family) und Malat1 in den neuronalen Zellkernen der Brodmann-Areale 17/18

Die Expressionsanalyse von 90 ncRNAs in den neuronalen Zellkernen der Brodmann-Areale 17/18 zeigt bei vier ncRNAs einen statistisch signifikanten Expressionsunterschied zwischen den schizophrenen Probanden und der Kontrollgruppe (vgl. Tabelle 3.4 und Tabelle 5.16).

Eine der vier ncRNAs ist die lncRNA LOC285194, deren genetische Sequenz auf dem Chromosom 3 liegt. Der Name LOC285194 geht auf die Gen-Kennnummer 285194 zurück [161].

Eine weitere ncRNA ist RNCR3, die ebenfalls den lncRNAs zugeordnet wird. Die genetische Information für RNCR3 liegt am Chromosom 8. Die Bezeichnung RNCR3 („retinal non-coding RNA 3“) leitet sich davon ab, dass die lncRNA zuerst im Zusammenhang mit der retinalen Entwicklung beschrieben wurde [162].

Auch die ncRNAs, die unter der Bezeichnung TEA ncRNAs (family) zusammengefasst werden, zeigen eine veränderte Expression bei Schizophrenie. Die genetische Information der TEA ncRNAs (family) liegt am Chromosom 14. Mit „TEA“ wird ein Promotor („T early α “) im Bereich eines Genes Tcra („t-cell receptor alpha“) bezeichnet; dieser Promotor enthält nicht-kodierende Sequenzen, die die Bezeichnung TEA ncRNAs (family) erhalten haben [163].

Die letzte hier zu erwähnende ncRNA ist Malat1, deren genetische Sequenz am Chromosom 11 liegt [164, 165]. Die Bezeichnung Malat1 („metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1“) bezieht sich darauf, dass die lncRNA zuerst im Zusammenhang mit Tumorerkrankungen publiziert wurden.

Die negativen FC-Werte der lncRNAs LOC285194, RNCR3 und TEA ncRNAs (family) und die Einzelwertdiagramme drücken eine verminderte Expression der drei lncRNAs in der Gruppe der schizophrenen Probanden gegenüber der Kontrollgruppe aus (vgl. Einzelwertdiagramme: LOC285194: Abbildung 5.3, RNCR3: Abbildung 3.7, TEA ncRNAs (family): Abbildung 5.4).

3 Ergebnisse

Der positive FC-Wert und das Einzelwertdiagramm der lncRNA Malat1 zeigen eine erhöhte relative Expression in der Gruppe der schizophrenen Probanden gegenüber der Kontrollgruppe (vgl. Einzelwertdiagramm: Abbildung 3.8).

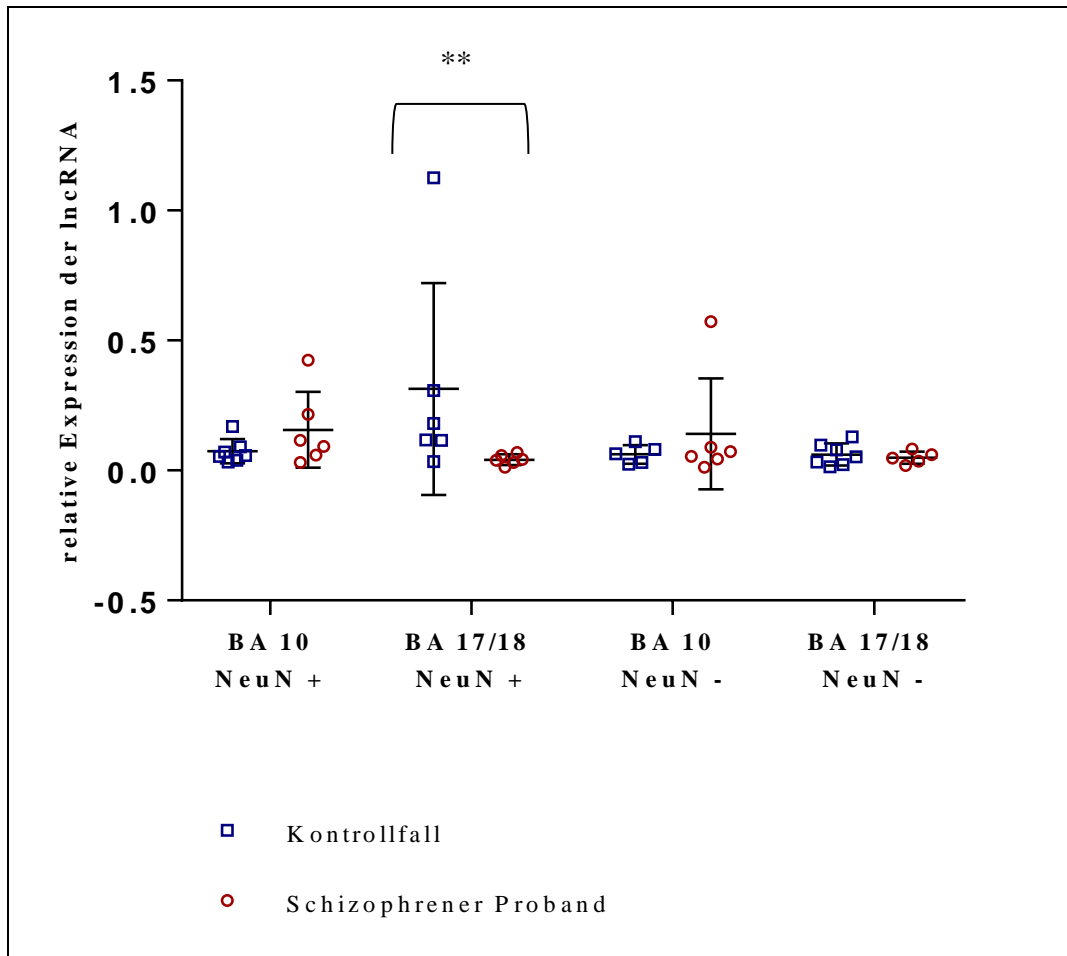


Abbildung 3.7: Einzelwertdiagramm der relativen Expression von RNCR3

Darstellung der relativen Expression von RNCR3 (Y-Achse) in den untersuchten Hirnregionen und Zelltypen (X-Achse). Abgebildet sind die individuellen Expressionsdatenpunkte der einzelnen Probanden (blaue Vierecke: Kontrollfälle; rote Kreise: Schizophrene Probanden), die Mittelwerte (horizontale Linien) und die Standardabweichungen (vertikale Linien).

*In den neuronalen Zellkernen der Brodmann-Areale 17/18 unterscheidet sich die relative Expression der lncRNA RNCR3 zwischen den schizophrenen Probanden und der Kontrollgruppe statistisch signifikant (**).*

3 Ergebnisse

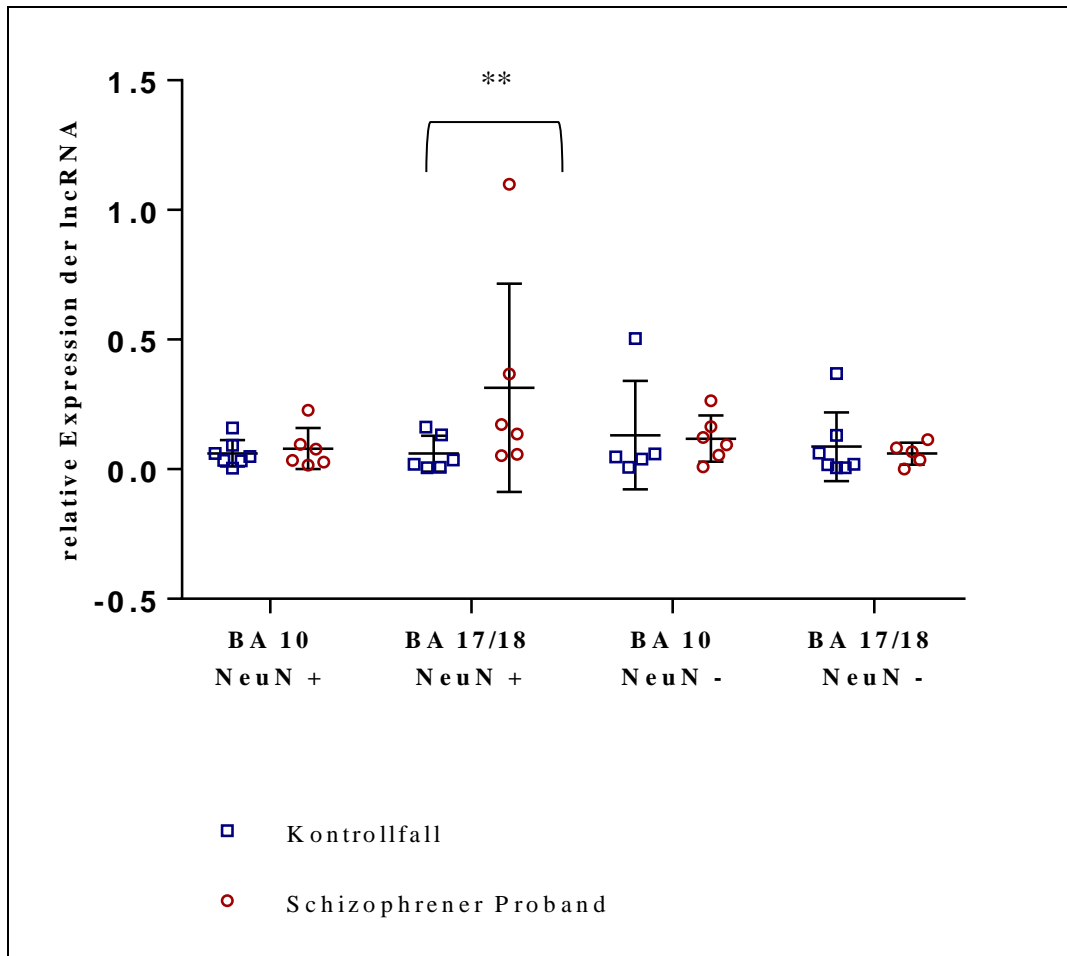


Abbildung 3.8: Einzelwertdiagramm der relativen Expression von Malat1

Darstellung der relativen Expression von Malat1 (Y-Achse) in den untersuchten Hirnregionen und Zelltypen (X-Achse). Abgebildet sind die individuellen Expressionsdatenpunkte der einzelnen Probanden (blaue Vierecke: Kontrollfälle; rote Kreise: Schizophrene Probanden), die Mittelwerte (horizontale Linien) und die Standardabweichungen (vertikale Linien).

*In den neuronalen Zellkernen der Brodmann-Areale 17/18 unterscheidet sich die relative Expression der lncRNA Malat1 zwischen den schizophrenen Probanden und der Kontrollgruppe statistisch signifikant (**).*

3.3.2.1.3 Expressionsunterschied der lncRNA Har1B in den glialen Zellkernen des Brodmann-Areals 10

Die Analyse der Expression von 90 ncRNAs in den glialen Zellkernen des Brodmann-Areals 10 ergibt nur bei einer lncRNA, Har1B, eine statistisch signifikant veränderte Expression bei Schizophrenie (vgl. Tabelle 3.4 und Tabelle 5.17).

Har1B ist eine lncRNA, deren genetische Information auf dem Chromosom 20 liegt. Har1B ist das Antisense-Transkript der lncRNA Har1A [166]. Die Bezeichnung Har1 leitet sich von der Region Har1 („human accelerated region 1“) ab, die sich innerhalb der Sequenz der lncRNAs befindet. Die Har-Regionen sind für Menschen spezifisch [167].

In bereits publizierter Literatur wurde über einen Zusammenhang der lncRNAs vom Har1-Lokus mit Schizophrenie spekuliert [119].

In der hier vorgelegten Arbeit verhält sich die relative Expression von Har1B und Har1A in den untersuchten Probandengruppen, Hirnregionen und Zelltypen ähnlich: In den neuronalen Zellkernen bewegt sich die relative Expression beider lncRNAs in der Kontrollgruppe und in der Gruppe der schizophrenen Probanden auf vergleichbarem Niveau. In den glialen Zellkernen manifestiert sich eine verringerte relative Expression beider lncRNAs in der Gruppe der schizophrenen Probanden. Diese Tendenz tritt im Brodmann-Areal 10 deutlich hervor; in den Brodmann-Arealen 17/18 ist die Aussagekraft durch die stärkere Streuung der Werte in der Kontrollgruppe vermindert (vgl. Abbildung 3.9 und Abbildung 3.10). Trotz der beobachteten, verringerten Expression der lncRNAs Har1A und Har1B in den glialen Zellkernen der Brodmann-Areale 10 und 17/18, ist nur der Expressionsunterschied der lncRNA Har1B in den glialen Zellkernen des Brodmann-Areals 10 statistisch signifikant.

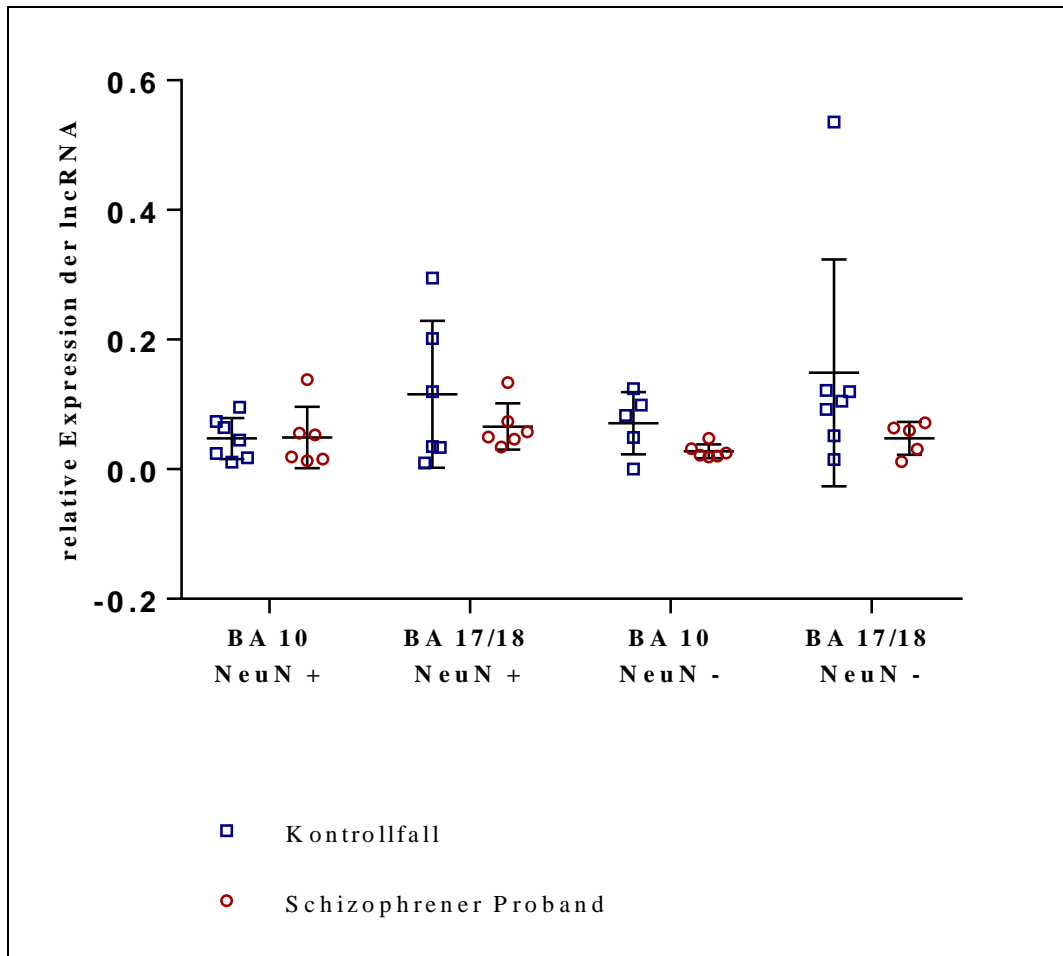


Abbildung 3.9: Einzelwertdiagramm der relativen Expression von Har1A

Darstellung der relativen Expression von Har1A (Y-Achse) in den untersuchten Hirnregionen und Zelltypen (X-Achse). Abgebildet sind die individuellen Expressionsdatenpunkte der einzelnen Probanden (blaue Vierecke: Kontrollfälle; rote Kreise: Schizophrene Probanden), die Mittelwerte (horizontale Linien) und die Standardabweichungen (vertikale Linien).

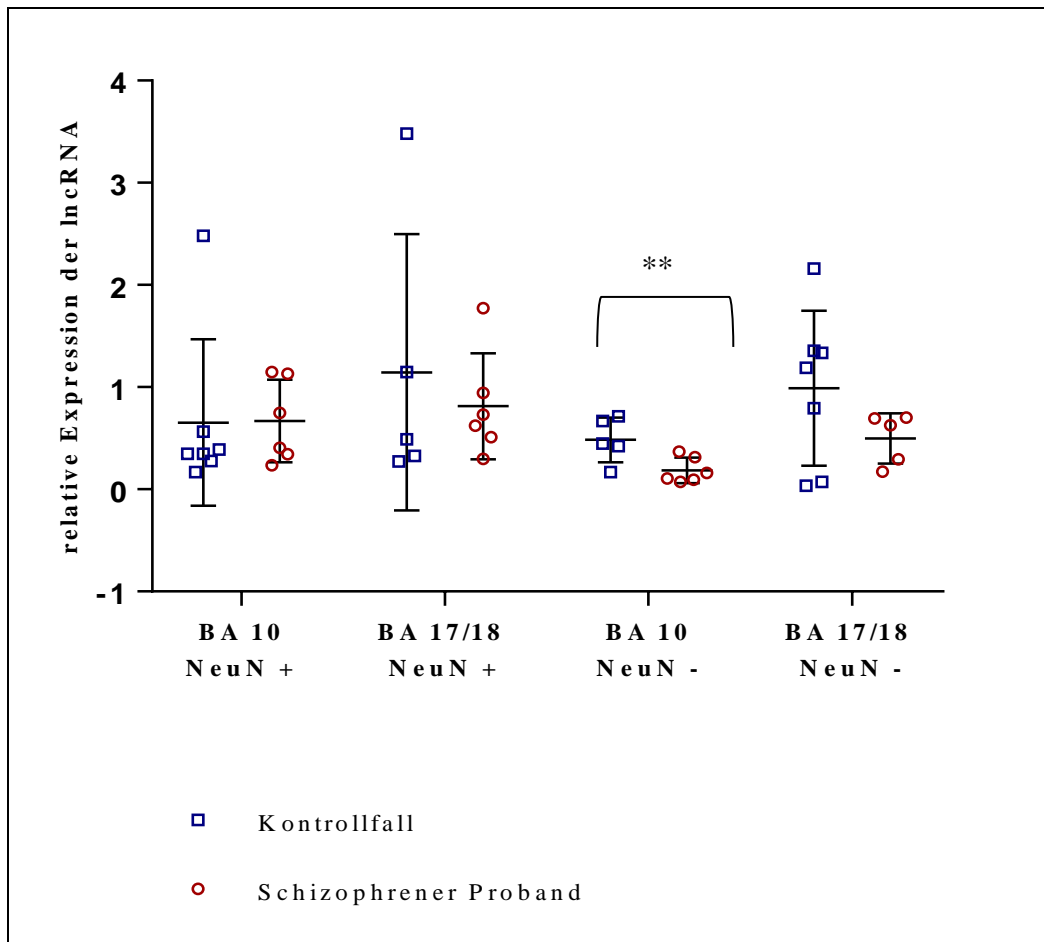


Abbildung 3.10: Einzelwertdiagramm der relativen Expression von Har1B*

Darstellung der relativen Expression von Har1B (Y-Achse) in den untersuchten Hirnregionen und Zelltypen (X-Achse). Abgebildet sind die individuellen Expressionsdatenpunkte der einzelnen Probanden (blaue Vierecke: Kontrollfälle; rote Kreise: Schizophrene Probanden), die Mittelwerte (horizontale Linien), die Standardabweichungen (vertikale Linien) und die statistische Signifikanz (**).

*Die Standardabweichungen sind bei der relativen Genexpression der lncRNA Har1B relativ groß. Im dargestellten Streudiagramm fehlt ein stark abweichender Wert (K5 in den neuronalen Zellkernen der Brodmann-Areale 17/18), weil die starke Deviation des einzelnen Wertes keine Differenzierung der anderen Messwerte zulassen würde.

3 Ergebnisse

3.3.2.1.4 Expressionsunterschied der ncRNAs IPW, Kcnq1ot1, mascRNA, SNHG6, BACE1AS (family) und DHFR upstream transcripts (family) in den glialen Zellkernen der Brodmann-Areale 17/18

Die Expressionsanalyse der ncRNAs in den glialen Zellkernen der Brodmann-Areale 17/18 zeigt, dass sich die Expression von sechs ncRNAs statistisch signifikant zwischen den schizophrenen Probanden und der Kontrollgruppe unterscheidet (vgl. Tabelle 3.4 und Tabelle 5.18).

Eine der ncRNAs ist die lncRNA IPW. Die genetische Information von IPW ist am Chromosom 15 lokalisiert [118] und befindet sich in einer Region, die bei Patienten mit Prader-Willi-Syndrom verändert ist [168]. Davon leitet sich die Bezeichnung IPW („Imprinted gene in the Prader-Willi Syndrom region“) ab [169].

Eine weitere ncRNA ist die lncRNA Kcnq1ot1, deren genetische Information am Chromosom 11 liegt und vom paternalen Allel exprimiert wird. Kcnq1ot1 („Kcnq1 overlapping transcript 1“) ist das Antisense-Transkript vom Genlokus Kcnq1 (offizielle Bezeichnung: „potassium voltage-gated channel subfamily Q member 1“). Der Genlokus Kcnq1 beinhaltet acht bis zehn Gene, die vom maternalen Allel exprimiert werden [170].

Die dritte hier vorzustellende ncRNA ist die mascRNA. Die mascRNA ist eine ncRNA, die von der lncRNA Malat1 abgespalten wird. Darauf geht die Bezeichnung mascRNA („Malat1-associated small cytoplasmic RNA“) zurück [171, 172].

Eine weitere ncRNA dieser Gruppe ist SNHG6. Die lncRNA SNHG6 ist ein Antisense-Transkript, deren genetische Sequenz am Chromosom 8 liegt. Wie aus der Bezeichnung SNHG6 („small nucleolar RNA host gene 6“) hervorgeht, beherbergt SNHG6 eine snoRNA [165]. SnoRNAs sind mittlere ncRNAs [108].

Die fünfte zu erwähnende ncRNA ist BACE1AS (family). Die genetische Sequenz der lncRNA BACE1AS (family) ist als Antisense-Transkript zum Gen BACE1 („β-site of APP cleaving enzyme“, Beta-Sekretase) am Chromosom 11 lokalisiert [119].

Die letzten hier vorzustellenden ncRNAs werden unter der Bezeichnung DHFR upstream transcripts (family) zusammengefasst. Die genetische Information der

DHFR upstream transcripts (family) liegt auf dem Chromosom 5 im Promotorbereich des Gens für die Dihydrofolatreduktase (DHFR) [173].

Die Expression der ncRNAs IPW, Kcnq1ot1, mascRNA und SNHG6 ist in der Gruppe der schizophrenen Probanden verglichen mit der Kontrollgruppe vermindert. Dies ist sowohl an den negativen FC-Werten (vgl. Tabelle 3.4 und Tabelle 5.18) als auch an der Verteilung der Datenpunkte in den Einzelwertdiagrammen zu erkennen (Einzelwertdiagramme: IPW: Abbildung 5.5, Kcnq1ot1: Abbildung 5.6, mascRNA: Abbildung 5.7, SNHG6: Abbildung 3.11).

Die FC-Werte der lncRNAs BACE1AS (family) und DHFR upstream transcripts (family) liegen im positiven Bereich (vgl. Tabelle 3.4 und Tabelle 5.18) und weisen, wie auch die Verteilung der Expressionsdatenpunkte der Einzelwertdiagramme, auf eine erhöhte Expression bei Schizophrenie hin (Einzelwertdiagramme: BACE1AS (family): Abbildung 3.12, DHFR upstream transcripts (family): Abbildung 5.8).

3 Ergebnisse

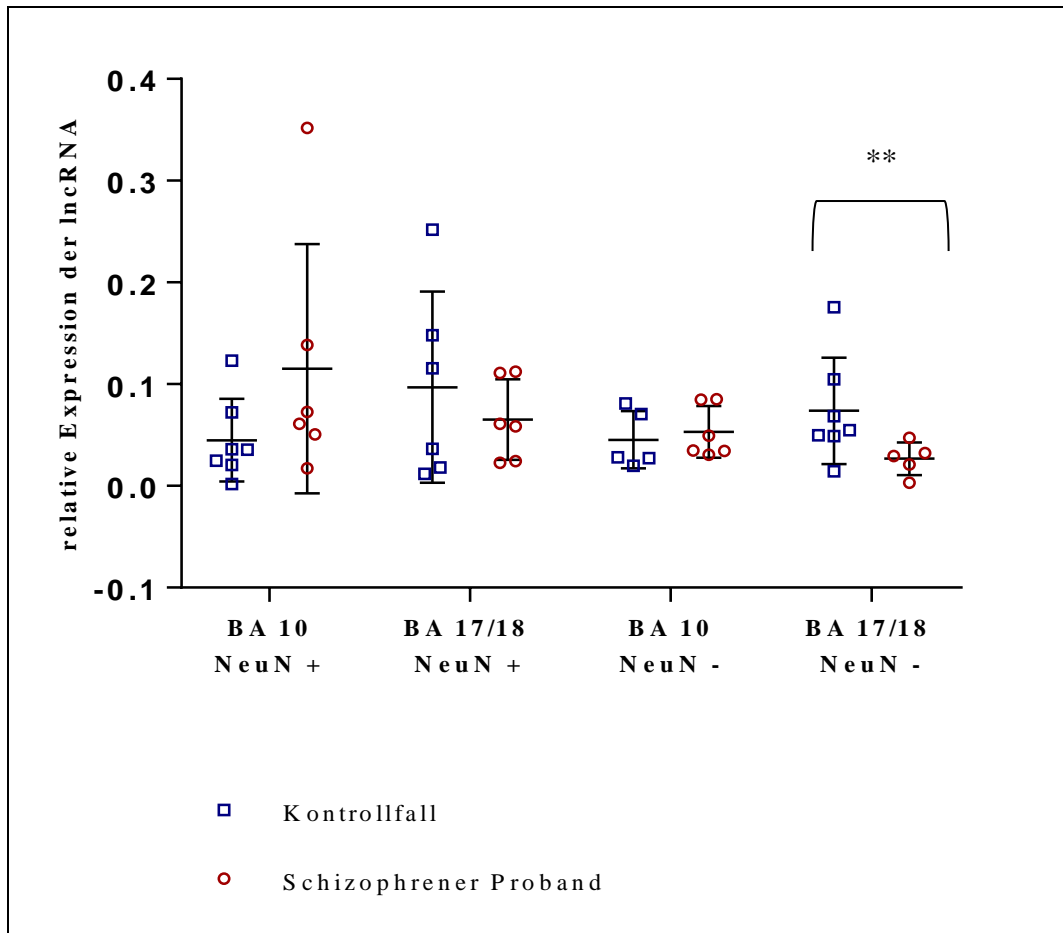


Abbildung 3.11: Einzelwertdiagramm der relativen Expression von SNHG6

Darstellung der relativen Expression von SNHG6 (Y-Achse) in den untersuchten Hirnregionen und Zelltypen (X-Achse). Abgebildet sind die individuellen Expressionsdatenpunkte der einzelnen Probanden (blaue Vierecke: Kontrollfälle; rote Kreise: Schizophrene Probanden), die Mittelwerte (horizontale Linien) und die Standardabweichungen (vertikale Linien).

*In den glialen Zellkernen der Brodmann-Areale 17/18 unterscheidet sich die relative Expression der lncRNA SNHG6 zwischen den schizophrenen Probanden und der Kontrollgruppe statistisch signifikant (**).*

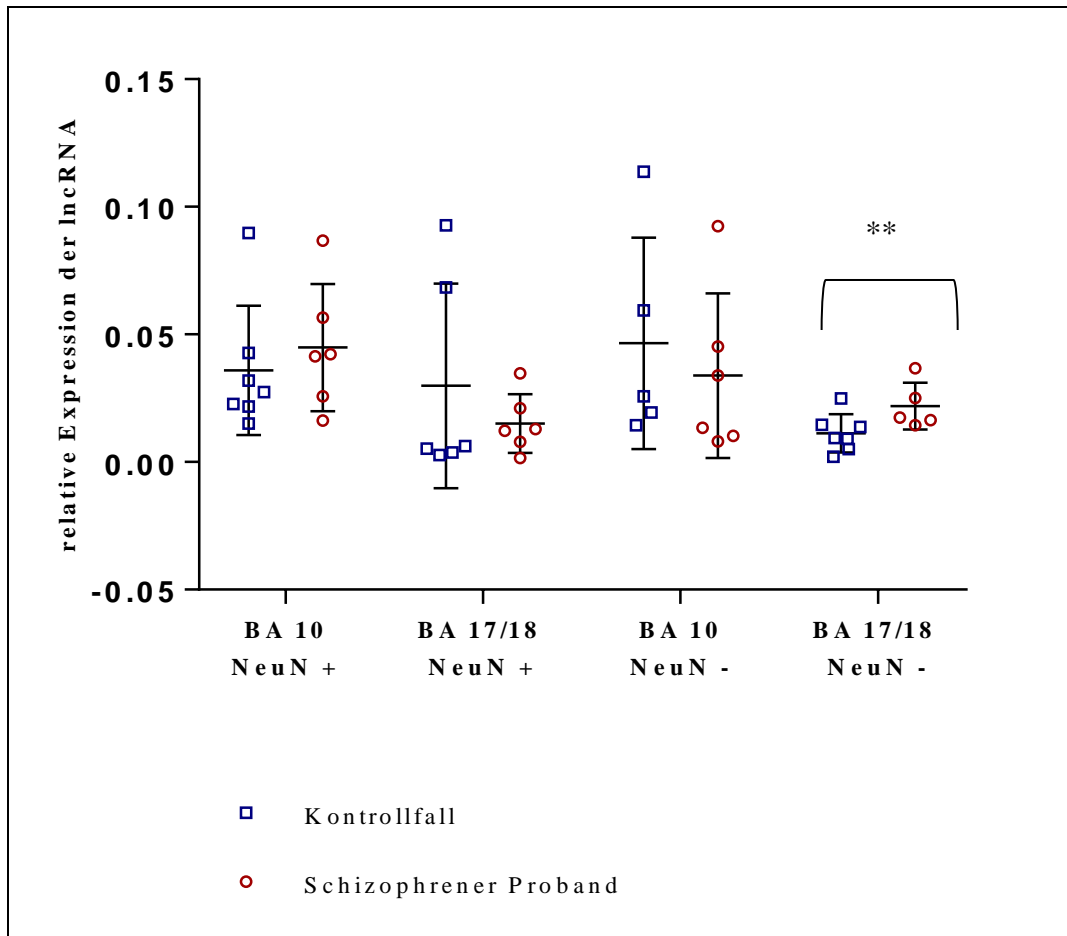


Abbildung 3.12: Einzelwertdiagramm der relativen Expression von BACE1AS (family)

Darstellung der relativen Expression von BACE1AS (family) (Y-Achse) in den untersuchten Hirnregionen und Zelltypen (X-Achse). Abgebildet sind die individuellen Expressionsdatenpunkte der einzelnen Probanden (blaue Vierecke: Kontrollfälle; rote Kreise: Schizophrene Probanden), die Mittelwerte (horizontale Linien) und die Standardabweichungen (vertikale Linien).

*In den glialen Zellkernen der Brodmann-Areale 17/18 unterscheidet sich die relative Expression der lncRNA BACE1AS (family) zwischen den schizophrenen Probanden und der Kontrollgruppe statistisch signifikant (**).*

3.3.2.2 LncRNAs im Zusammenhang mit der Erkrankung Schizophrenie

Im folgenden Kapitel werden drei lncRNAs vorgestellt, die gemäß einzelner Publikationen in die Pathogenese der Erkrankung Schizophrenie involviert sein könnten [119, 121, 166].

Eine der drei lncRNAs ist DISC-2. Die genetische Sequenz für die lncRNA DISC-2 liegt als Antisense-Transkript des Gens DISC-1 auf dem Chromosom 1. In zahlreichen Studien wurden Veränderungen des DISC-1 Gens mit der Erkrankung Schizophrenie belegt [121, 174]. Davon leitet sich auch die Abkürzung DISC („disrupted in schizophrenia“) ab.

Eine weitere lncRNA ist Gomafu, die synonym die Bezeichnung MIAT („myocardial infarction associated transcript“) trägt. Die genetische Information der lncRNA Gomafu liegt auf dem Chromosom 22. Eine Studie von Barry et al. zeigt, dass die lncRNA mit Genen (beispielsweise DISC-1) interagiert, die mit Schizophrenie assoziiert sind. Neben dieser indirekten Verbindung zur Erkrankung Schizophrenie publizierten Barry et al. eine verminderte Expression der lncRNA Gomafu im grauen Kortexgewebe des Gyrus temporalis superior bei Schizophrenie [120, 121].

Die dritte lncRNA ist Evf2. Die genetische Information der lncRNA Evf2 ist am Chromosom 7 lokalisiert [173]. Evf2 scheint Gene zu regulieren, die mit der Pathogenese der Schizophrenie assoziiert werden. Deswegen wird auch über eine potentielle Rolle von Evf2 bei der Erkrankung Schizophrenie spekuliert [121]. In der vorliegenden Arbeit wurden die lncRNAs Evf1 und Evf2 gemeinsam untersucht. Evf1 und Evf2 haben die gleiche genetische Sequenz, sind aber unterschiedlich gespleißt [175].

Vorliegend kann kein Unterschied der relativen Expression der lncRNAs DISC-2, Gomafu und Evf1 und Evf2 zwischen der Gruppe der schizophrenen Probanden und der Kontrollgruppe in den untersuchten Hirnregionen und Zelltypen beobachtet werden (vgl. Tabelle 5.15 bis 5.5.18).

Auch die Verteilung der Expressionsdatenpunkte in den Einzelwertdiagrammen zeigt keinen erkennbaren Verteilungsunterschied zwischen den schizophrenen

Probanden und der Kontrollgruppe (Einzelwertdiagramm: DISC-2: Abbildung 3.13, Gomaflu: Abbildung 5.9, Evf1 und Evf2: Abbildung 5.10).

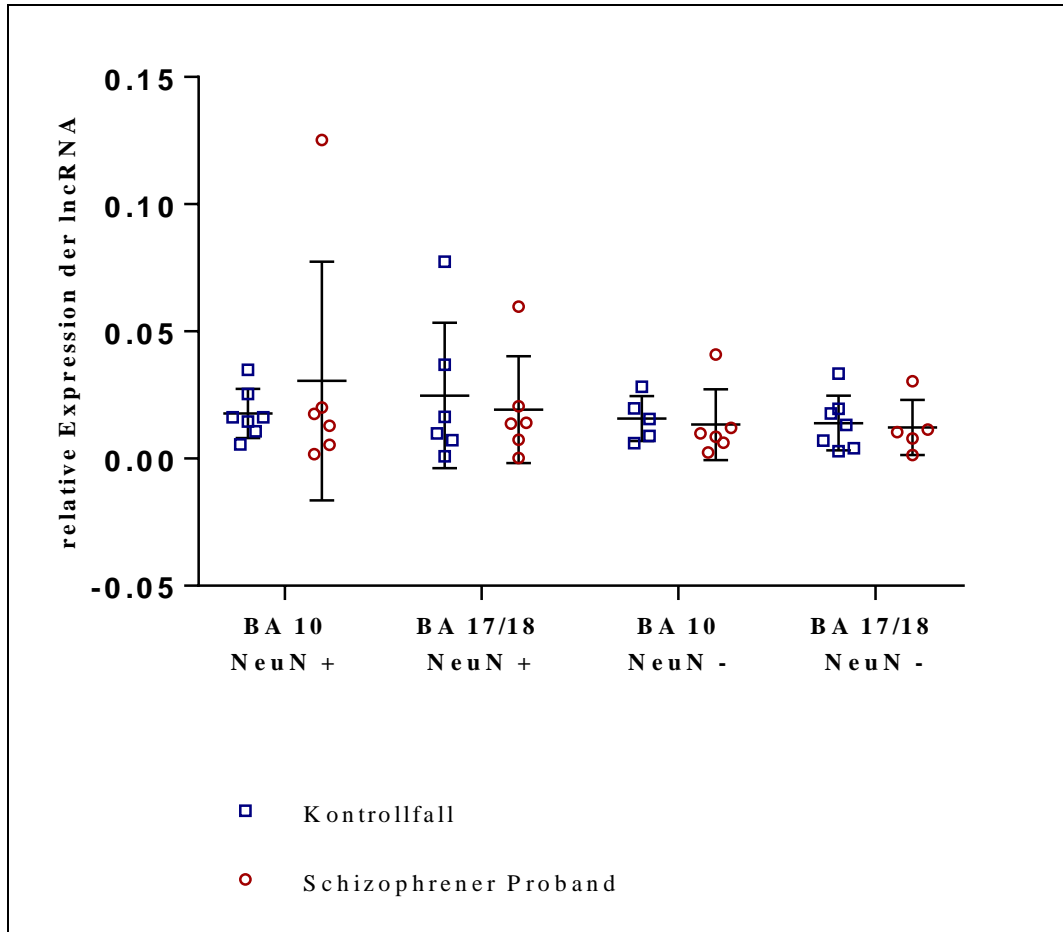


Abbildung 3.13: Einzelwertdiagramm der relativen Expression von DISC-2

Darstellung der relativen Expression von DISC-2 (Y-Achse) in den untersuchten Hirnregionen und Zelltypen (X-Achse). Abgebildet sind die individuellen Expressionsdatenpunkte der einzelnen Probanden (blaue Vierecke: Kontrollfälle; rote Kreise: Schizophrene Probanden), die Mittelwerte (horizontale Linien) und die Standardabweichungen (vertikale Linien).

3 Ergebnisse

3.3.2.3 Weitere untersuchte ncRNAs

Bei weiteren 72 ncRNAs zeigt die Expressionsanalyse keinen statistisch signifikanten Expressionsunterschied zwischen der Gruppe der schizophrenen Probanden und der Kontrollgruppe (vgl. Tabelle 5.15 bis 5.18).

Bei den ncRNAs 7SK, 21A, Air, AK023948, antiPeg11, Alpha 280, Alpha 250, ANRIL, anti-NOS2A, BC200, CAR Intergenic 10, Dio3os (family), DLG2AS (family), Ego A, Ego B, Emx2os, GAS5-family, H19, H19 antisense, H19 upstream conserved 1 &2, HOTAIR, HOTAIRM1, HOTTIP, Hoxa11as, HULC, IGF2AS (family), KRASP1, L1PA16, lincRNA-p21, lincRNA-RoR, lincRNA-SFMBT2, lincRNA-VLDLR, Lust, MEG3 (family), MER11C, NDM29, NEAT1 (family), Nespas, NRON, NTT, PCGEM1, PR antisense transcripts, PRINS, PSF inhibiting RNA, PTENP1, SAF, SCA8, snaR, SNHG1, SNHG4, SNHG5, Sox2ot, SRA, Tmevpg1, TncRNA, Tsix, TUG1 (family), UCA1, UM9-5, Xist, Y RNA-1, Zeb2NAT und Zfas1 liegt in keiner untersuchten Hirnregion und in keinem untersuchten Zelltyp der berechnete p-Wert unter 0,1.

Bei 13 der 72 lncRNAs kann zumindest eine tendenziell veränderte Expression gezeigt werden: Die berechneten p-Werte liegen zwischen 0,05 und 0,1. In den neuronalen Zellkernen des Brodmann-Areals 10 trifft dies auf die ncRNAs Air, BC200, KRASP1, ncR-uPAR und SNHG6 zu und in den neuronalen Zellkernen der Brodmann-Areale 17/18 auf die ncRNAs HOXA3as, HOXA6as und WT1-AS. In den glialen Zellkernen des Brodmann-Areals 10 können bei den ncRNAs 7SL, E2F4 antisense, MEG9 und TEA ncRNAs (family) niedrige p-Werte beobachtet werden und in den glialen Zellkernen der Brodmann-Areale 17/18 bei den ncRNAs 7SK, H19 und SNHG3.

Besonders hervorzuheben sind in diesem Zusammenhang die lncRNAs SNHG6 und TEA ncRNAs (family), weil bei beiden lncRNAs in einer anderen Hirnregion bzw. einem anderen Zelltyp die Expression statistisch signifikant verändert ist (vgl. SNHG6: Kapitel 3.3.2.1.4 und TEA ncRNAs (family) Kapitel 3.3.2.1.2).

4 Diskussion

4.1 Allgemeine Erwägungen zu Fall-Kontroll-Studien bei Schizophrenie

Schizophrenie ist eine seltene Erkrankung [3, 4, 6, 7]. Deswegen steht postmortales Gewebe zu Studienzwecken von vornherein nur stark limitiert zur Verfügung [5, 8]. So konnte auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit nur eine kleine Probandengruppe untersucht werden. Bei der Interpretation der Daten muss berücksichtigt werden, dass bei kleinen Probandengruppen einzelne Probanden, deren Werte stark abweichen, besonders ins Gewicht fallen. So können tatsächlich bei Schizophrenie bestehende Veränderungen übersehen werden [176] oder Veränderungen detektiert werden, die nicht real sind [155, 176].

Die Erkrankung Schizophrenie zeichnet sich durch ein unscharfes und breitgefächertes Spektrum an Symptomen aus. Einige Wissenschaftler vermuten, dass die interindividuell unterschiedlichen Symptome auf verschiedene pathologische Prozesse zurückzuführen sein könnten [5, 43]. Um diese Problematik einzugrenzen, wurden in die vorliegende Arbeit nur Probanden mit einer Schizophrenie residuellen Typs (DSM-IV: 295.60) eingeschlossen. Ob dieses diagnostische Kriterium ausreichend ist, um eine hinsichtlich der Erkrankung homogene Probandengruppe zu erhalten, ist noch nicht nachgewiesen. Dazu kommt, dass die schizophrenen Probanden zu Lebzeiten unterschiedlich therapiert wurden. So könnten sich auch Unterschiede in der medikamentösen Therapie auf die Studienergebnisse auswirken [5].

In diesem Sinne soll die vorliegende Arbeit als initiales Screening auf interessante Tendenzen im Zusammenhang mit epigenetischen Veränderungen bei Schizophrenie aufmerksam machen und Ausgangspunkte für weitere Untersuchungen aufzeigen.

4.2 Anzahl neuronaler und glialer Zellkerne bei Schizophrenie

Die vorliegende Arbeit analysiert die Anzahl neuronaler und glialer Zellkerne in den Brodmann-Arealen 10 und 17/18 mittels Durchflusszytometrie. Die Untersuchungsergebnisse zeigen keine Abweichung in der Anzahl der neuronalen Zellkerne, aber einen statistisch nicht signifikanten Verlust der glialen Zellkerne bei Schizophrenie.

Insgesamt gibt es zu dieser Thematik wenig Vergleichsliteratur. Die im Folgenden zitierten Studien, sind – wie die vorliegende Arbeit – als Fall-Kontroll-Studien aufgebaut und basieren auf der Untersuchung von postmortalem Gewebe. Abweichend von der vorliegenden Arbeit, befassen sich die Studien nicht mit der Anzahl der neuronalen bzw. glialen Zellkerne sondern mit der Anzahl der Zellen (Neuronen bzw. Gliazellen). Außerdem untersuchen die zitierten Studien die Anzahl der Hirnzellen im präfrontalen bzw. occipitalen Kortex oder in einzelnen Brodmann-Arealen, die diesen Regionen zugeordnet werden. So sind die zitierten Studien mit der vorliegenden Arbeit zwar hinsichtlich der Hirnregion (präfrontaler bzw. occipitaler Kortex) kongruent, unterscheiden sich aber teilweise hinsichtlich der untersuchten Brodmann-Areale.

Die Tabelle 4.1 gibt einen Überblick über die verschiedenen Studien.

4 Diskussion

Tabelle 4.1: Studienüberblick- Anzahl der Neuronen und Gliazellen im präfrontalen oder occipitalen Kortex bei Schizophrenie

Autor	Fälle ¹	Hirnregion	Zellpopulation	Methode	Ergebnis bei Schizophrenie
Akbarian et al. 1995	10:10	Dorsolateraler präfrontaler Kortex*	Neurone	Stereologische Analyse	Kein Verlust von Neuronen
Thune et al. 2000	8:10	Präfrontalen Kortex*	Neurone	Stereologische Analyse	Geringer Verlust von Neuronen
Stark et al. 2004	12:14	Präfrontaler Kortex: BA 24 und 32	Neurone & Gliazellen	Stereologische Analyse	Kein Verlust von Neuronen BA 24: Verlust von Gliazellen BA 32: Kein Verlust von Gliazellen
Uranova et al. 2007	16:16	BA 10	Oligodendrozyten	Stereologische Analyse	Abnahme der Oligodendrozyten
Vostikov et al. 2004-2008	12:12	BA 9 und 10	Oligodendrozyten	Stereologische Analyse	Verlust von Oligodendrozyten-Subgruppen
Dorph-Petersen et al. 2007	10:10	BA 17	Neurone	Stereologische Analyse	Verlust von Neuronen
Eigene Daten 2017	7:7	Brodmann-Areale 10 und 17/18	Neurone & Gliazellen	Durchflusszytometrie	Kein Verlust von Neuronen Geringer Verlust von Gliazellen

*umfasst mehrere Brodmann-Areale; ¹: Schizophrene Probanden : Kontrollfälle; BA = Brodmann-Areal

4.2.1 Anzahl der Neurone im präfrontalen Kortex bei Schizophrenie

Akbarian et al. [177], Thune et al. [37] und Stark et al. [178] untersuchten die Anzahl der Neurone im präfrontalen Kortex bei Schizophrenie.

Während Thune et al. Gewebe aus dem gesamten präfrontalen Kortex verwendeten [37], beschränkten sich Akbarian et al. auf den dorsolateralen, präfrontalen Kortex (Brodmann-Areale 8, 9 und 46) [45, 177] und Stark et al. auf die Brodmann-Areale 24 und 32 [178], die ein Teilgebiet des präfrontalen Kortex sind (vgl. Abbildung 1.2).

Alle drei Studien verwendeten stereologische Methoden, wobei Thune et al. und Stark et al. die optische Disektor Methode anwandten [37, 178].

Obwohl Thune et al. eine statistisch nicht signifikante Abnahme der Neurone um etwa 11 % bei Schizophrenie zeigten [37], kamen alle drei Arbeitsgruppen zu dem Endergebnis, dass die Gesamtanzahl der Neurone im präfrontalen Kortex bei Schizophrenie nicht statistisch signifikant verändert ist [37, 177, 178].

4.2.2 Anzahl der Neurone im occipitalen Kortex bei Schizophrenie

Dorph-Petersen et al. untersuchten die Anzahl der Neurone im Brodmann-Areal 17 des occipitalen Kortex und verwendeten die stereologische Methode „Optical Fractionator“.

Die Studie von Dorph-Petersen et al. beobachtete eine statistisch signifikante Abnahme der Neurone um 25% bei Schizophrenie, die mit einer Volumenminderung des Brodmann-Areals 17 einherging [35].

4.2.3 Anzahl der Gliazellen im präfrontalen Kortex bei Schizophrenie

Stark et al. [178] und Uranova und Vostrikov et al. [179-182] analysierten die Anzahl der Gliazellen im präfrontalen Kortex bei Schizophrenie.

Stark et al. untersuchten die Brodmann-Areale 24 und 32 [178], Uranova et al. das Brodmann-Areal 10 [179] und Vostrikov et al. die Brodmann-Areale 9 und 10 [181, 182]. Stark et al. analysierten, wie auch die vorliegende Arbeit, die hetero-

4 Diskussion

gene Gruppe der Gliazellen [178], Uranova et al. die Oligodendrozyten [179] und Vostrikov et al. die perikapillären [181] und perineuronalen Oligodendrozyten [182].

Alle drei Gruppen arbeiteten mit stereologischen Untersuchungen; Stark et al. mit der Disektor-Methode [178] und Uranova et al. und Vostrikov et al. mit elektronenmikroskopischen Untersuchungen [179, 181, 182].

Stark et al. wiesen mit ihrer Studie im Brodmann-Areal 24 einen statistisch signifikanten Verlust von 33 % der Gliazellen bei Schizophrenie nach; im Brodmann-Areal 32 beschrieben sie hingegen keine Abnahme der Gliazellen bei Schizophrenie [178].

Uranova et al. stellten im Gewebe der schizophrenen Probanden degenerative Anzeichen der Oligodendrozyten wie Apoptose und Nekrose fest. Zusammenfassend vermuteten sie deswegen eine Abnahme der Oligodendrozyten [179].

Vostrikov et al. beschrieben eine Abnahme der perikapillären und perineuronalen Oligodendrozyten bei Schizophrenie [181, 182].

4.2.4 Anzahl der Gliazellen im occipitalen Kortex bei Schizophrenie

Vergleichsliteratur ist nicht vorhanden.

4.2.5 Unterschiede in der Methodik

Alle Studien, die im Literaturvergleich zitiert werden, verwendeten Methoden aus dem Spektrum der stereologischen Methoden. Diese gelten als Goldstandard für Zellzahlzählungen.

In der vorliegenden Arbeit wurde zur Aufteilung der Zellkerne in die Population der neuronalen und glialen Zellkerne die Methode der Durchflusszytometrie angewandt. Die Methode wurde vor allem verwendet, weil mit den extrahierten Zellkernen weitere epigenetische Untersuchungen durchgeführt werden sollten. Dabei ermöglicht die Durchflusszytometrie die Analyse vieler Zellkerne in kurzer Zeit. So stand eine große Datenmenge zur hier vorgestellten quantitativen Analyse zur Verfügung.

Aus der Verwendung unterschiedlicher Methoden ergibt sich die Frage, ob die Methoden ebenbürtig und vergleichbar sind. Mit dieser Fragestellung setzten sich Collin et al., Miller et al. und Young et al. [183-185] auseinander. Unabhängig voneinander analysierten die Gruppen jeweils Gewebeproben der gleichen Probanden mit unterschiedlichen Methoden – darunter stereologische Methoden und die Methode der Durchflusszytometrie. Alle drei Gruppen zeigten, dass die Menge der gemessenen Hirnzellen unabhängig von den angewandten Messmethoden ist, und konstatierten eine Vergleichbarkeit der verschiedenen getesteten Methoden [183-185].

4.2.6 Interpretation und Empfehlungen für weitere Studien

4.2.6.1 Analyse: Anzahl der Neurone bei Schizophrenie

Das Ergebnis der vorliegenden Arbeit und die Ergebnisse der zitierten Studien von Akbarian et al. [177], Thune et al. [37] und Stark et al. [178] erhärten die These, dass die Anzahl der Neurone bei Schizophrenie nicht verändert ist. Im Widerspruch dazu stehen die Ergebnisse von Dorph-Petersen et al. [35].

Auch publizierte Metaanalysen, wie die Arbeiten von Heckers [26] und Harrison [5], kommen zu einem ähnliche ambivalenten Ergebnis wie der hier vorgestellte Literaturvergleich: Obwohl die Mehrzahl der Studien keine Abnahme der Neurone zeigt, belegen einzelne Studien – darunter auch manche Replikationsstudien – eine Abnahme der Neurone bei Schizophrenie [5, 26].

Dorph-Petersen et al. diskutieren die Hypothese, dass eine Abnahme der Neurone bei Schizophrenie nur in einzelnen Hirnarealen auftreten könnte. Möglicherweise werde die Abnahme der Neurone in einem Brodmann-Areal durch eine Zunahme der Neurone in einem anderen Areal kompensiert [35]. Folgt man der Hypothese von Dorph-Petersen et al. könnten bei Studien, die große Hirnregionen untersuchen, Veränderungen in einzelnen Brodmann-Arealen übersehen werden.

Möglicherweise ist die Anzahl der Neurone aber auch kein grundlegender Aspekt in der Pathogenese der Erkrankung Schizophrenie [26]. Vielmehr könnten potentielle Größenveränderungen oder Dysfunktionen der Neurone eine Rolle spielen [5].

An dieser Stelle empfiehlt sich eine weitere Untersuchung mit möglichst vielen Probanden, von denen Gewebe aus verschiedenen Hirnregionen zur Verfügung steht. So könnten die Anzahl und die Größe der Neurone in verschiedenen Brodmann-Arealen mit der gleichen Methodik und dem gleichen Studienkollektiv bestimmt werden. Eine solche Studie könnte die Interpretation der bereits publizierten, teilweise widersprüchlichen Ergebnisse aus verschiedenen Studien erleichtern.

4.2.6.1 Analyse: Anzahl der Gliazellen bei Schizophrenie

Die vorliegende Arbeit belegt einen statistisch nicht signifikanten Verlust an glialen Zellkernen in den Brodmann-Arealen 10 und 17/18 bei Schizophrenie. Der Verlust der Gliazellen in der vorliegenden Arbeit könnte zum Großteil auf einen Verlust von Oligodendrozyten zurückzuführen sein, da die Oligodendrozyten mit 75 % die dominierende Subpopulation der Gliazellen im grauen Kortexgewebe darstellen [30, 32]. Es wäre sogar möglich, dass der Verlust der Oligodendrozyten größer ist als die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit vermuten lassen, denn eine potentielle Zunahme der Astrogliazellen oder Mikrogliazellen könnte sich kompensatorisch niederschlagen [64].

Auch die Arbeiten von Uranova und Vostrikov et al. [179-182] und aktuelle Studien aus anderen Hirnregionen (beispielsweise von Falkai et al. [2]) vertreten die These, dass Schizophrenie mit einer Abnahme der Oligodendrozyten korreliert. In der Literatur wird folglich den Oligodendrozyten eine essentielle Rolle in der Pathogenese der Schizophrenie eingeräumt [27, 43]. Darüber hinaus wurde auch eine Abnahme der Myelierung der Nervenfasern bei Schizophrenie beobachtet. Diese könnte eine Folge des Verlusts von Oligodendrozyten darstellen [27].

Insgesamt bekräftigen das Ergebnis der vorliegenden Arbeit sowie die Ergebnisse der zitierten Studien von Stark et al. [178] und Uranova und Vostrikov et al. [179-182] die These, dass die Gliazellen, insbesondere die Oligodendrozyten, ein interessantes und wichtiges Forschungsfeld für die Erkrankung Schizophrenie darstellen. Die Arbeit könnte als Anknüpfungspunkt für weitere Untersuchungen dienen, die sich näher mit der Anzahl der Subpopulationen der Gliazellen bei Schizophrenie in den Brodmann-Arealen 10 und 17/18 befassen.

4.3 Veränderte ncRNA-Expression bei Schizophrenie

Die vorliegende Arbeit untersuchte die Expression von 90 ncRNAs mittels RT-PCR und weist eine veränderte Expression von 14 ncRNAs bei Schizophrenie nach.

Wie im Kapitel 1.1.2.4 angesprochen, gibt es zahlreiche Hypothesen über die Ätiologie der Erkrankung Schizophrenie. Vor allem werden Störungen der (Hirn-) Entwicklung [20, 44], der Myelierung von Nervenfasern [39, 42] und der regenerativen Prozesse [2, 44] als sehr relevant für die Pathogenese eingeschätzt. Im Folgenden wird diskutiert wie die ncRNAs, deren Expression vorliegend bei Schizophrenie verändert ist, mit diesen Theorien in Zusammenhang stehen könnte.

4.3.1. Veränderte RNA-Expression in den neuronalen Zellkernen des Brodmann-Areals 10

4.3.1.1 Jpx und Schizophrenie

Die lncRNA Jpx ist am X-Chromosom lokalisiert [158] und vor allem in der Embryonalentwicklung hoch exprimiert [158].

Jpx wird neben der lncRNA Xist eine Funktion bei der Inaktivierung eines X-Chromosoms im weiblichen Organismus zugesprochen [164, 186]. Auf molekularer Ebene soll Jpx die Regulation der Transkription von Xist beeinflussen. Beide lncRNAs sind auf dem X-Chromosom, das inaktiviert werden soll, aktiviert [173].

Die vorliegende Arbeit zeigt bei Schizophrenie eine erhöhte Expression von Jpx in den neuronalen Zellkernen des Brodmann-Areals 10. Möglicherweise steht dieses Ergebnis mit den häufig publizierten strukturellen Veränderungen am X-Chromosom bei Schizophrenie in Zusammenhang [16]. Außerdem könnte die veränderte Expression von Jpx darauf hindeuten, dass die Erkrankung Schizophrenie mit Störungen in der Embryonalentwicklung zusammenhängt [20, 44].

4.3.1.2 ST7OT und Schizophrenie

ST7OT soll eine regulatorische Funktion für das ST7-Gen haben. ST7 wird eine Bedeutung in der Pathogenese von Tumorerkrankungen und Autismus zugesprochen [118, 159]. Wie diese Regulation des ST7-Gens durch ST7OT aussieht und wie sie auf molekularer Ebene verwirklicht wird, ist noch nicht geklärt [187].

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit weisen eine verstärkte Expression von ST7OT in den neuronalen Zellkernen des Brodmann-Areals 10 bei Schizophrenie nach. Aus ätiologischer Sicht könnte die Assoziation von Autismus und Schizophrenie mit demselben Genlokus interessant sein, denn für beide Erkrankungen gelten Störungen in der Individualentwicklung als potentielle Auslöser [188].

4.3.1.3 p53 mRNA und Schizophrenie

P53 mRNA ist die mRNA, die zum Protein p53 translatiert wird. Das Protein p53 scheint Zellen mit DNA-Schäden zu erkennen, Reparaturmechanismen einzuleiten und, falls nötig, die Apoptose zu induzieren. Studien zufolge ist das Protein p53 bei vielen Tumoren stark angereichert [62]. In neuen Studien wurde der p53 mRNA eine regulatorische Funktion für die Expression von p53 zugesprochen, da Veränderungen der p53 mRNA zu einer verminderten Aktivität von p53 führen [160].

Parallel zur erhöhten p53-Expression bei Tumorerkrankungen zeigt die vorliegende Arbeit eine verstärkte Expression der p53 mRNA bei Schizophrenie in den neuronalen Zellkernen des Brodmann-Areals 10. Dies könnte als Indiz für eine Störung von regenerativen Prozessen der Neurone gedeutet werden (vgl. [2]).

4.3.2 Veränderte ncRNA-Expression in den neuronalen Zellkernen der Brodmann-Areale 17/18

4.3.2.1 LOC285194 und Schizophrenie

Die lncRNA LOC285194 scheint vom Protein p53 reguliert zu werden und soll das Wachstum von entarteten Tumorzellen unterdrücken (vgl. Kapitel 4.3.1.3).

Eine verringerte Expression der lncRNA LOC285194 wurde bei Colonkarzinomen beobachtet [161], gilt aber auch bei anderen Tumoren als Marker für eine ungünstige Prognose [189].

Parallel dazu ist in dieser Arbeit eine verminderte Expression von LOC285194 in den neuronalen Zellkernen der Brodmann-Areale 17/18 mit der Erkrankung Schizophrenie assoziiert. Auch dieses Ergebnis könnte die Hypothese stützen, dass Schizophrenie mit einer Störung von regenerativen Prozessen der Neurone einher geht (vgl. [2]).

4.3.2.2 RNCR3 und Schizophrenie

Die lncRNA RNCR3 scheint eine wichtige Rolle für das ZNS und für die Entwicklung von Neuronen und Oligodendrozyten zu spielen. Des Weiteren soll die lncRNA RNCR3 einen protektiven Effekt auf das vaskuläre System ausüben [162, 190].

Eine niedrige RNCR3-Expression scheint Arteriosklerose zu beschleunigen, bestehende Hypercholesterinämien zu verschlimmern und Defekte im ZNS zu verursachen [162].

Auch in der vorliegenden Arbeit korreliert eine verringerte RNCR3-Expression in den neuronalen Zellkernen der Brodmann-Areale 17/18 mit der Erkrankung Schizophrenie. Da RNCR3 in die Differenzierung der Neurone involviert zu sein scheint, könnte eine veränderte Expression von RNCR3 bei Schizophrenie ein Anzeichen für eine Störung der Differenzierungskreisläufe der Neurone sein [38].

4.3.2.3 TEA ncRNAs (family) und Schizophrenie

Studien zufolge bewirken die TEA ncRNAs (family) durch die Beeinflussung der Transkription die Vielfältigkeit der T-Zell-Rezeptoren [173]. Diese sind ein wichtiger Bestandteil der Immunabwehr.

Es wird diskutiert, ob die TEA ncRNAs (family) in die Pathogenese der Erkrankung Multiple Sklerose involviert sind [163, 191, 192]. Multiple Sklerose ist eine

Autoimmunerkrankung, die die Myelinscheiden im ZNS zerstört und die Nervenfasern angreift [193].

Die Untersuchungsergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen einen Zusammenhang zwischen der Expression von TEA ncRNAs (family) und Schizophrenie. In den neuronalen Zellkernen der Brodmann-Areale 17/18 sind die TEA ncRNAs bei Schizophrenie vermindert exprimiert; in den glialen Zellkernen des Brodmann-Areals 10 sind die TEA ncRNAs (family) tendenziell (nicht statistisch signifikant) verstärkt exprimiert.

Über einen Zusammenhang zwischen Multipler Sklerose und Schizophrenie wird schon seit 1988 spekuliert [194]. Eine Studie von Andreassen et al. zeigte, dass bestimmte Allele mit beiden Erkrankungen assoziiert sind [195]. Weitere Forschung über die molekulare Wirkweise der TEA ncRNAs (family) könnte sowohl für Multiple Sklerose als auch für Schizophrenie aus ätiologischer und therapeutischer Sicht interessant sein.

4.3.2.4 Malat1 und Schizophrenie

Die lncRNA Malat1 ist in Neuronen hoch und in Gliazellen niedrig exprimiert [196]. In Neuronen wird Malat1 eine Rolle in der Entwicklung neuer Synapsen und für deren Funktion zugesprochen [197]. Malat1 scheint auch eine regulatorische Rolle im Prozess des Spleißens und der Genregulation zu spielen [119, 173, 198].

Fehlregulationen der Expression von Malat1 werden mit zahlreichen Tumorerkrankungen und neurologischen Erkrankungen in Verbindung gebracht [119, 166, 172, 198].

Die Ergebnisse dieser Arbeit belegen in den neuronalen Zellkernen der Brodmann-Areale 17/18 eine erhöhte Expression von Malat 1 bei Schizophrenie. Diese könnte als Dysregulation in der Entwicklung der Neurone bei Schizophrenie interpretiert werden [38].

4.3.3 Veränderte Expression der ncRNAs Har1A und Har1B in den glialen Zellkernen des Brodmann-Areals 10

Die lncRNAs Har1A und Har1B sind vor allem in der frühen Entwicklungsphase des Neocortex hoch exprimiert. Har1A wird dabei zeitgleich mit dem Protein Reelin in den Cajal-Retzius-Neuronen exprimiert [166, 167]. Der Expressionszeitpunkt liegt in einer wichtigen Phase für die Entwicklung und Migration der Neurone, wofür das Protein Reelin eine entscheidende Rolle zu spielen scheint [199]. Im adulten Gehirn soll Reelin wichtig für die Funktion der Synapsen sein [200].

Über die Funktion der lncRNAs Har1A und Har1B ist bislang sehr wenig bekannt [167]. Teilweise wird die These vertreten, dass die lncRNA Har1A die Expression des Reelin-Proteins beeinflussen könnte [201].

Da ein Zusammenhang zwischen dem Protein Reelin mit der Erkrankung Schizophrenie publiziert ist [8, 166, 200], stellt sich die Frage, ob die lncRNAs Har1A und Har1B in die Pathogenese der Schizophrenie involviert sein könnten [119]. Eine Studie von Tolosa et al. wies keinen Zusammenhang zwischen der lncRNA Har1A und der Erkrankung Schizophrenie nach [201]. Bei Chorea-Huntington, einer autosomal-dominant vererbten, neurodegenerativen Erkrankung, wurde eine Abnahme der lncRNAs in der Har1-Region publiziert [202].

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bekräftigen eine Assoziation zwischen einer verminderten Expression der lncRNAs Har1A und Har1B in den glialen Zellkernen und der Erkrankung Schizophrenie, wenngleich nur die verminderte Expression der lncRNA Har1B in den glialen Zellkernen des Brodmann-Areals 10 statistisch signifikant ist.

4.3.4 Veränderte ncRNA-Expression in den glialen Zellkernen der Brodmann-Areale 17/18

4.3.4.1 IPW und Schizophrenie

Die lncRNA IPW wird vom paternalen Allel transkribiert. IPW scheint eine wichtige Rolle beim epigenetischen Imprinting einzunehmen [203] und an der Regula-

tion von maternal exprimierten Genen am Chromosom 14 mitzuwirken [204, 205].

Die lncRNA IPW ist vor allem mit dem Prader-Willi-Syndrom assoziiert. Das Prader-Willi-Syndrom ist eine seltene genetische Erkrankung mit körperlichen und geistigen Einschränkungen. Bei Patienten, die am Prader-Willi-Syndrom leiden, ist Studien zufolge IPW nicht exprimiert [159, 169].

Die Auswertung der Ergebnisse dieser Arbeit zeigt eine verringerte Expression von IPW in den glialen Zellkernen den Brodmann-Areale 17/18 bei Schizophrenie. Die veränderte Expression von IPW bei Schizophrenie könnte ein Anzeichen für Störungen in der Embryonalentwicklung, insbesondere beim Imprinting, sein [20, 44].

4.3.4.2 Kcnq1ot1 und Schizophrenie

Kcnq1ot1 ist eine lncRNA, die ebenfalls vom paternalen Allel exprimiert wird und dem Imprinting unterliegt. Die lncRNA Kcnq1ot1 scheint eine transkriptionelle Stilllegung des Kcnq1-Genlokus zu bewirken [170]. Diese Stilllegung soll über verschiedene Wege ablaufen, unter anderem über die Rekrutierung eines Protein-Komplexes (Polycomb-Komplex) [159] und/oder über eine Veränderung der Chromatinstruktur [170].

Veränderungen an der DNA-Sequenz der lncRNA Kcnq1ot1 wurden mit Tumorerkrankungen und mit dem Beckwith-Wiedemann-Syndrom, einer genetischen Erkrankung mit Fehlbildungen und einer erhöhten Tumorprädisposition, in Zusammenhang gebracht [206].

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen eine verringerte Kcnq1ot1-Expression in den glialen Zellkernen der Brodmann-Areale 17/18 bei Schizophrenie. Die veränderte Expression von Kcnq1ot1 könnte, wie schon die veränderte Expression von IPW, ein Anzeichen für eine Störung beim Imprinting sein (vgl. [20, 44]).

4.3.4.3 mascRNA und Schizophrenie

Die mascRNA wird von der lncRNA Malat1 abgespalten und nach der Abtrennung in das Zytoplasma transportiert. Die Menge der mascRNA könnte im Zytoplasma ein Signal dafür sein, wie viel Malat1 exprimiert wird. Inwieweit mascRNA eine eigenständige Funktion hat, ist weitgehend unbekannt [171, 172].

In der vorliegenden Arbeit stellt sich eine verminderte Expression der mascRNA in den glialen Zellkernen der Brodmann-Areale 17/18 bei den schizophrenen Probanden heraus. Die Expression von Malat1 bei Schizophrenie ist in der gleichen Hirnregion und Zellpopulation jedoch nicht verändert. Um diesen Zusammenhang interpretieren zu können, sind weitere Studien, die sich mit der Funktion und Wirkweise von Malat1 und mascRNA beschäftigen, notwendig.

4.3.4.4 SNHG6 und Schizophrenie

SNHG6 scheint an der Regulierung der Translation verschiedener Gene beteiligt zu sein [173], wenngleich insgesamt wenig über die Funktion der lncRNA bekannt ist.

Leberkarzinome scheinen mit einer erhöhten Expression von SNHG6 einher zu gehen [207].

Nach den in dieser Arbeit generierten Daten stellt sich die Expression von SNHG6 in den glialen Zellkernen der Brodmann-Areale 17/18 bei Schizophrenie vermindert, aber in den neuronalen Zellkernen des Brodmann-Areals 10 tendenziell (nicht statistisch signifikant) verstärkt heraus. Da selbst über die allgemeine Funktion und Wirkweise von SNHG6 sehr wenig bekannt ist, ist weitere Forschung zu dieser Thematik notwendig. Zum jetzigen Zeitpunkt können deswegen keine Hypothesen zur Rolle von SNHG6 in der Pathogenese von Schizophrenie aufgestellt werden.

4.3.4.5 BACE1AS (family) und Schizophrenie

Die lncRNA BACE1AS (family) scheint die Expression des Gens BACE1 zu regulieren. Das Protein BACE1 soll mehrere wichtige Funktionen erfüllen: Zum

einen scheint BACE1 an der Spaltung des Amyloid-Vorläufer-Proteins in zwei Peptidasen mitzuwirken, die unter dem Namen Beta-Amyloid zusammengefasst werden [208]. Zum anderen scheint BACE1 in die Regulation der Myelierung von Nervenfasern im zentralen und peripheren Nervensystem involviert zu sein [208].

BACE1AS (family) und BACE1 sind Studien zufolge bei der Alzheimer-Erkrankung erhöht exprimiert. BACE1AS (family) scheint über eine posttranskriptionelle Regulation bei der Alzheimer-Erkrankung zu einer erhöhten Stabilität der mRNA von BACE1 zu führen. Möglicherweise trägt dies zu der Anreicherung des Beta-Amyloids im Gehirn bei, die für die Alzheimer-Erkrankung charakteristisch ist [112, 113, 119, 159, 173, 209].

Vorliegend ist die Expression von BACE1AS (family), parallel zur erhöhten Expression bei Morbus Alzheimer, in den glialen Zellkernen der Brodmann-Areale 17/18 bei den schizophrenen Probanden verstärkt. Weil BACE1 wichtig für die Regulation der Myelierung der Nervenfasern zu sein scheint [208], könnte dieses Ergebnis ein Hinweis auf eine verminderte Myelierung bei Schizophrenie sein [27, 41, 42].

Die genetische Sequenz von BACE1AS (family) ist auf 11q23.3 lokalisiert. Dieser Aspekt ist interessant, weil in einer Metaanalyse von Lewis et al. unter anderem die Gene der chromosomalen Region von 11q22 bis 11q24 als Suszeptibilitätsgene für Schizophrenie eingestuft wurden (zitiert nach Tandon et al. [16]).

4.3.4.6 DHFR upstream transcripts (family) und Schizophrenie

Die genetische Information der DHFR upstream transcripts (family) liegt im Promotorbereich des Gens der Dihydrofolatreduktase (DHFR) [173]. DHFR scheint in allen Geweben vorzukommen, das Vitamin Folsäure zu aktivieren und essenziell für die DNA-Synthese zu sein [210].

Die Expression der lncRNAs der DHFR upstream transcripts (family) scheint sich hemmend auf die Transkription des Gens DHFR auszuwirken [159, 173]. Eine niedrige DHFR-Expression wiederum korreliert mit einem erhöhten Risiko für Tumorerkrankungen [210].

Analog dazu stellt die vorliegende Arbeit eine verstärkte Expression der lncRNAs DHFR upstream transcripts (family) in den glialen Zellkernen der Brodmann-Areale 17/18 bei Schizophrenie fest. Diese geht wahrscheinlich mit einer verminderten Expression von DHFR einher. Diese Beobachtung könnte ein Hinweis auf eine Störung der regenerativen Prozesse der glialen Zellkerne bei Schizophrenie sein [2].

4.3.5 Unveränderte Expression der ncRNAs DISC-2, Gomafu und Evf2 bei Schizophrenie

Die vorliegende Arbeit beschreibt bei weiteren 72 ncRNAs keine statistisch signifikante, krankheitsspezifische Veränderung der Expression.

Die Expressionsergebnisse von drei dieser 72 ncRNAs werden im Folgenden diskutiert, weil teilweise von einer Korrelation dieser ncRNAs mit Schizophrenie ausgegangen wird [121].

4.3.5.1 DISC-2

Die lncRNA DISC-2 ist das Antisense-Transkript des Gens DISC-1. DISC-1 ist vor allem im Gehirn stark exprimiert. Die Funktion des DISC-1-Proteins ist bislang unklar, möglicherweise spielt DISC-1 eine Rolle bei der Reifung von Neuronen und bei der Regulation des Dopamin-Signals. Es wird vermutet, dass DISC-2 die Expression des Gens DISC-1 beeinflusst [121, 191, 211].

Da Veränderungen des DISC-1-Genlokus bei der Erkrankung Schizophrenie publiziert sind [121, 174, 212], wird auch ein Zusammenhang von DISC-2 mit der Erkrankung vermutet. Allerdings ist kein direkter Zusammenhang zwischen DISC-2 und der Erkrankung Schizophrenie belegt.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit ist weder im Brodmann-Areal 10 noch in den Brodmann-Arealen 17/18 eine veränderte Expression von DISC-2 beobachtet worden.

4.3.5.2 Evf2

Die lncRNA Evf2 soll auf molekularer Ebene über eine Regulierung der Transkription [173] von Genen wirken, die für die Entwicklung von Interneuronen notwendig sind [159].

Evf2 scheint unter anderem die Transkription von Genen zu regulieren, die mit der Pathogenese der Schizophrenie assoziiert werden. Deswegen wird über eine Rolle von Evf2 bei der Erkrankung Schizophrenie spekuliert [121].

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen keinen Anhaltspunkt für eine veränderte Expression von Evf2. Da die Expression der lncRNAs Evf1 und Evf2 jedoch gemeinsam getestet wurde, kann mit dieser Arbeit keine Aussage über die einzelne Expression von Evf2 getroffen werden.

4.3.5.3 Gomafu

Die lncRNA Gomafu ist vor allem in den Neuronen exprimiert [120]. Barry et al. zeigten, dass die lncRNA Gomafu Spleißing-Faktoren reguliert [121] und Verbindungen zu Genen eingeht, die mit Schizophrenie assoziiert sind, beispielsweise DISC-1. Neben dieser indirekten Verbindung zur Erkrankung Schizophrenie publizierten Barry et al. auch eine direkte Verbindung, bei der die lncRNA Gomafu im grauen Kortexgewebe des Gyrus temporalis superior, einem Teilbereich des Temporallappens, bei Schizophrenie vermindert exprimiert war [120].

In der vorliegenden Arbeit kann weder im Brodmann-Areal 10 noch in den Brodmann-Arealen 17/18 eine veränderte Expression von Gomafu detektiert werden.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit stehen insofern nicht im Widerspruch mit den Ergebnissen von Barry et al., da unterschiedliche Hirnareale untersucht wurden [120]. Gomafu könnte in einzelnen Hirnarealen bei Schizophrenie verändert und gleichzeitig in anderen Hirnarealen unverändert exprimiert sein.

4.3.6 Interpretation

4.3.6.1 Analyse der vorliegenden Arbeit

Die Ergebnisse der Expressionsanalyse von 90 ncRNAs bestätigen einen Zusammenhang zwischen der Erkrankung Schizophrenie und der Expression von ncRNAs. Zusammenfassend lassen sich folgende Schlussfolgerungen aus der vorliegenden Arbeit ableiten:

1. Die Arbeit belegt bei 14 ncRNAs einen statistisch signifikanten Expressionsunterschied zwischen der Gruppe der schizophrenen Probanden und der Kontrollgruppe. Bei 13 weiteren ncRNAs zeigen sich ebenfalls Expressionsunterschiede, die jedoch nicht statistisch signifikant sind.
2. Es scheint keinen generellen Trend zu einer erhöhten oder verminderten Expression von ncRNAs bei Schizophrenie zu geben: Die relative Expression von acht ncRNAs ist in der Gruppe der schizophrenen Probanden gegenüber der Kontrollgruppe erhöht und die relative Expression von sechs ncRNAs vermindert.
3. Von der veränderten ncRNA Expression bei der Erkrankung Schizophrenie scheint sowohl der präfrontale als auch der occipitale Kortex betroffen zu sein. Die Expression von vier ncRNAs unterscheidet sich im Brodmann-Areal 10 zwischen den schizophrenen Probanden und der Kontrollgruppe; im Brodmann-Areal 17/18 ist die Expression von zehn ncRNAs unterschiedlich.
4. Die Expression der hier untersuchten ncRNAs scheint zelltypspezifisch zu sein: Bei sieben ncRNAs liegt der gemessene Expressionsunterschied in den neuronalen und bei sieben ncRNAs in den glialen Zellkernen.
5. Der statistisch signifikante Expressionsunterschied zwischen den schizophrenen Probanden und der Kontrollgruppe wird bei allen 14 ncRNA jeweils nur in einem Zelltyp und einer Hirnregion gemessen. Nur die lncRNAs SNHG6 und TEA ncRNAs (family) zeigen in einem weiteren Zelltyp bzw. einer weiteren Hirnregion zumindest einen p-Wert unter 0,1.
6. Die genetischen Sequenzen der 14 ncRNAs kommen im gesamten Genom und auf unterschiedlichen Chromosomen vor. Auffällig ist allerdings die

Häufung am Chromosom 11, auf dem vier der 14 ncRNAs lokalisiert sind (Malat1, mascRNA, Kcnq1ot1 und BACE1AS).

4.3.6.2 Empfehlung für weitere Studien

Die vorliegend beobachtete, veränderte Expression von 14 ncRNAs bei Schizophrenie belegt, dass ncRNAs im Gehirn schizophrener Probanden ein interessantes Feld für weitere Forschungsarbeit darstellen.

Da die vorliegende Arbeit hinsichtlich ihrer überblicksartigen Untersuchung der Expression von 90 ncRNAs bei Schizophrenie bislang einzigartig ist, ist eine Replikation mit einem unabhängigen Studienkollektiv notwendig.

Darüber hinaus empfehlen sich Cross-Over-Studien, die die Expression der ncRNAs auch in anderen Geweben untersuchen. Hierfür eignen sich besonders Blutzellen wie beispielsweise Lymphozyten [85], da eine Untersuchung des Blutes auch zu Lebzeiten komplikationslos durchgeführt werden kann. Womöglich kann dadurch eine ncRNA als Biomarker für die Erkrankung Schizophrenie identifiziert werden.

5 Anhang

5.1 Abkürzungen

5mC	Methylcytosin
BA 10	Brodmann-Areal 10
BA 17/18	Brodmann-Areale 17 und 18
BK	Bisulfitkonvertierung
C	Cytosin-Base
cDNA	komplementäre DNA
CNV	Copy Number Variation
CpG	Cytosin-Guanin-Dinukleotid
Cq-Wert	Quantification cycle
DHFR	Dihydrofolatreduktase
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSM-4	Diagnostischer und statistischer Leitfaden psychiatrischer Störungen, 4. Auflage
DSM-5	Diagnostischer und statistischer Leitfaden psychiatrischer Störungen, 5. Auflage
EKT	Elektrokonvulsionstherapie
FC	Fold Change
GRE	Glucocorticoid-Response-Element
h^2	Erblichkeit
K	Kontrollfall
lincRNA	long intergenic non-coding RNA
lncRNA	lange nicht-kodierende RNA
MW	Mittelwert
N:G	Verhältnis der neuronalen zu den glialen Zellkernen
ncRNA	nicht-kodierende RNA
NeuN -	gliale Zellkerne
NeuN +	neuronale Zellkerne
OC	occipitaler Kortex
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFC	präfrontaler Kortex

PMI	postmortales Intervall
RIN	RNA Integrity Number
RNA	Ribonukleinsäure
RT-PCR	real-time-PCR
S	schizophrener Proband
SD	Standardabweichung
SDM	Second Derivative Maximum Methode
snoRNA	small nucleolar RNAs
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
T	Thymin-Base
U-Test	Mann-Whitney U-Test
ZNS	Zentrales Nervensystem

5.2 Materialien

In den folgenden Tabellen sind die verwendeten Materialien, sowie die Herstellerfirmen und die Bestellnummern zusammengefasst.

Tabelle 5.1: Materialien

Kapitel	Material	Firma	Bestellnummer
2.2	Sucrose	Merck, München, Deutschland	S7903
2.2	CaCl ₂	Merck, München, Deutschland	C5080
2.2	Mg(Ac) ₂	Merck, München, Deutschland	M2545
2.2	Tris-HCl	Merck, München, Deutschland	PHG0002
2.2	PMSF	Merck, München, Deutschland	P7626
2.2	DTT	Merck, München, Deutschland	D0632
2.2	Igepal	Merck, München, Deutschland	I3021
2.2	EDTA	Merck, München, Deutschland	E5134
2.2	Protease Inhibitor Cocktail Tabs	Roche, Basel, Schweiz	04693124001
2.2	KCl	Merck, München, Deutschland	P9333
2.2	NaCl	Merck, München, Deutschland	S7653
2.2	KH ₂ PO ₄	Merck, München, Deutschland	P5655
2.2	NaHPO ₄	Merck, München, Deutschland	S7907
2.2	Dounce-Homogenisator	Kimble, Meiningen, Deutschland	885300-0002

2.2	Ultrazentrifugenröhrchen	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	3699
2.2	Mouse anti-NeuN, clone A60	Millipore, Eschborn, Deutschland	MAB 377
2.2	Alexa Fluor® 546 goat anti-mouse IgG (H+L)	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland	A11003
2.2	DAPI	Roth, Karlsruhe, Deutschland	6335.1
2.2	QIamp DNA Micro Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland	56304
2.2	ATL-Puffer	Qiagen, Hilden, Deutschland	19076
2.2	Proteinkinase K	Qiagen, Hilden, Deutschland	19133
2.2	AL-Puffer	Qiagen, Hilden, Deutschland	19075
2.2	miRNeasy Micro Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland	217084
2.2	QIAzol Lysis Reagens	Qiagen, Hilden, Deutschland	79306
2.2	Agilent RNA 6000 Pico Kit	Agilent Technologies, Santa Clara, USA	5067-1513
2.3	EpiTect® Fast DNA Bisulfite Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland	59824
2.3	Multiplex PCR Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland	206143
2.3	5x Flash Gel ®Loading Dye	Lonza, Basel, Schweiz	50462
2.3	40 x Running Buffer Stock Solution	Serva, Heidelberg, Deutschland	3031.01
2.3	Flash Gel ® DNA Marker	Lonza, Basel, Schweiz	57033
2.3	DNA Clean & Concentratorkit	Zymo Research, Irvine, USA	D4014
2.3	BigDyeTerminator v3.1 Cycle Sequencingkit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	4337455
2.3	Dye Ex 2.0 Spin Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland	63206
2.3	Micro Amp Optical 96-Well Reaction Plate	Applied Biosystems, Waltham, USA	8010560

5 Anhang

2.3	96-Well Plate Septa	Applied Biosystems, Waltham, USA	4315933
2.3	HiDi Formamid	Applied Biosystems, Waltham, USA	4311320
2.4	LncProfiler qPCR Array Kit	BioCat, Heidelberg, Deutschland	RA900A-1-SBI
2.4	SensiFAST™ SYBR No-ROX	Bioline, Luckenwalde, Deutschland	BIO-98020
2.4	96well FrameStar Platte	4titude, Berlin, Deutschland	4ti-0952

Tabelle 5.2: Verwendete Geräte

Kapitel	Bezeichnung	Firma
2.2	Ultrazentrifuge: Sorvall Discovery 90 SE	Sorvall, Breda, Niederlande
2.2	Rotor der Ultrazentrifuge: Sorvall TH-641	Sorvall, Breda, Niederlande
2.2	Durchflusszytometer: BD FACSAria TM II	Becton Dickinson Biosciences, Franklin Lakes, USA
2.2	ND-1000 Spektrophotometer (Nanodrop)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
2.2	Agilent-2100-Bioanalyzer	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
2.3	Mastercycler EP Gradient	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
2.3	Flash Gel System inkl. Dock und Kamera und Flash Gel DNA Cassette	Lonza, Basel, Schweiz
2.3	Sequenzierer: ABI 3130	Applied Biosystems, Waltham, USA
2.3	Sequencing Analysis Software 6	Applied Biosystems, Waltham, USA
2.4	Light Cycler 488 II device	Roche, Basel, Schweiz
2.4	Zentrifuge für lncRNA-Platten: Centrifuge 5430	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
2.2; 2.3; 2.4	Zentrifuge: Centrifuge 5804R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

5.3 Ergebnisse der Durchflusszytometrie und der DNA/RNA-Extraktion

Tabelle 5.3: Ermittelte Zellkernanzahl, eingesetzte Gewebemenge und normalisierte Zellkernmenge

Fall	Brodmann-Areal 10					Brodmann-Areale 17/18				
	NeuN + [Mio.]	NeuN - [Mio.]	Gewebemenge [mg]	NeuN + norm.	NeuN - norm.	NeuN + [Mio.]	NeuN - [Mio.]	Gewebe- gewebe [mg]	NeuN + norm.	NeuN - norm.
K1	3,96	5,31	1200	0,33	0,44	*	*	*	*	*
K2	10,25	5,67	1000	1,03	0,57	*	*	*	*	*
K3	2,84	2,06	800	0,36	0,26	5,38	1,48	800	0,67	0,19
K4	*	*	*	*	*	4,31	2,47	800	0,54	0,31
K5	3,02	2,82	800	0,38	0,35	7,12	3,3	800	0,89	0,41
K6	2,7	3,49	740	0,36	0,47	4,88	3,47	800	0,61	0,43
K7	4,4	5,48	800	0,55	0,69	4,62	4,43	800	0,58	0,55
K8	1,72	1,05	600	0,29	0,18	5,26	1,98	800	0,66	0,25
K9	*	*	*	*	*	9,25	2,17	800	1,16	0,27
S1	*	*	*	*	*	2,31	1,19	800	0,29	0,15
S2	2,92	2,37	800	0,37	0,30	4,28	1,66	800	0,54	0,21
S3	2,97	2,09	800	0,37	0,26	4,37	1,29	800	0,55	0,16
S4	*	*	*	*	*	8,21	2,03	800	1,03	0,25

S5	1,79	1,6	800	0,22	0,20	*	*	*	*	*
S6	5,1	2,54	800	0,64	0,32	6,46	3,32	800	0,81	0,42
S7	3,33	2,3	800	0,42	0,29	7,89	2,12	800	0,99	0,27
S8	6,5	1,77	800	0,81	0,22	6,48	1,61	800	0,81	0,20
S9	0,34	0,1	129	0,33	0,19	*	*	*	*	*

*In der Tabelle sind die am Durchflusszytometer gemessenen Zellkernmengen (NeuN +: Neuronale Zellkerne; NeuN -: Gliale Zellkerne), die dafür eingesetzte Gewebemenge der einzelnen Probanden (K: Kontrollfall; S: Schizophrener Proband; *: Nicht untersucht) sowie die Ergebnisse der Normalisierung (norm.: Zellkerne (Mio.) je 100 mg eingesetztes Kortextgewebe (vgl. Kapitel 2.2.1.4)) zusammengefasst.*

Tabelle 5.4: Ermittelte Zellkernanzahl und extrahierte und normalisierte DNA-Menge

Brodmann-Areal 10							Brodmann-Areale 17/18					
Fall	NeuN + [Mio.]	DNA [µg]	NeuN + norm.	NeuN - [Mio.]	DNA [µg]	NeuN- norm.	NeuN + [Mio.]	DNA [µg]	NeuN + norm.	NeuN - [Mio.]	DNA [µg]	NeuN – norm.
K1	2,16	3,38	1,56	1,81	1,34	0,74	*	*	*	*	*	*
K2	3,74	3,29	0,88	2,10	1,25	0,60	*	*	*	*	*	*
K3	1,54	3,45	2,24	1,43	1,68	1,17	2,85	3,01	1,06	0,31	0,32	1,03
K4	*	*	*	*	*	*	3,30	3,27	0,99	1,22	1,23	1,01
K5	1,80	2,38	1,32	0,70	0,48	0,69	3,02	2,97	0,98	1,09	0,83	0,76
K6	1,90	2,14	1,13	1,70	0,63	0,37	3,09	5,2	1,68	2,04	0,86	0,42
K7	2,60	3,4	1,31	3,50	3,24	0,93	4,26	2,62	0,62	2,26	1,18	0,52
K8	1,47	3,05	2,07	0,87	1,99	2,29	2,13	1,59	0,75	1,2	1,93	1,61
K9	*	*	*	*	*	*	4,03	2,01	0,50	1,18	1,18	1,00
S1	*	*	*	*	*	*	0,74	1,50	2,03	0,42	0,30	0,71
S2	2,03	2,52	1,24	1,68	1,17	0,70	1,49	2,38	1,60	0,38	0,38	1,00
S3	1,69	2,3	1,36	1,41	1,8	1,28	2,54	1,26	0,50	0,43	0,31	0,72
S4	*	*	*	*	*	*	3,78	4,06	1,07	1,29	1,4	1,09
S5	1,09	2,15	1,97	0,70	1,11	1,59	*	*	*	*	*	*
S6	3,1	4,59	1,48	1,60	1,82	1,14	5,18	0,44	0,08	1,72	0,54	0,31

S7	2,45	1,97	0,80	1,76	1,52	0,86	3,62	2,94	0,81	1,02	1,05	1,029
S8	4,5	7,13	1,58	0,73	1,54	2,11	3,31	2,88	0,87	0,78	0,75	0,962
S9	1,60	1,72	1,08	0,80	0,88	1,10	*	*	*	*	*	*

*In der Tabelle sind die Menge der Zellkerne, die zur DNA-Extraktion verwendet wurde (NeuN +: Neuronale Zellkerne; NeuN -: Gliale Zellkerne), die extrahierte DNA-Menge, sowie die normalisierte DNA-Menge (norm.: DNA-Menge [pg] pro Zellkern) je Proband (K: Kontrollfall; S: Schizophrener Proband; *: Nicht untersucht) zusammengefasst.*

Tabelle 5.5: Ermittelte Zellkernanzahl und extrahierte und normalisierte RNA-Menge

Fall	Brodmann-Areal 10						Brodmann-Areale 17/18					
	NeuN + [Mio.]	RNA [µg]	NeuN + norm.	NeuN - [Mio.]	RNA [µg]	NeuN - norm.	NeuN + [Mio.]	RNA [µg]	NeuN + norm.	NeuN - [Mio.]	RNA [µg]	NeuN - norm.
K1	1,8	0,93	0,52	3,50	0,64	0,18	*	*	*	*	*	*
K2	6,51	5,23	0,8	3,57	0,45	0,13	*	*	*	*	*	*
K3	1,3	0,59	0,45	0,63	0,31	0,49	2,53	1,87	0,74	1,17	0,37	0,32
K4	*	*	*	*	*	*	1,01	1,12	1,11	1,25	0,34	0,27
K5	1,22	0,94	0,77	2,12	0,82	0,39	4,10	1,87	0,46	2,21	0,77	0,35
K6	0,80	0,58	0,73	1,79	0,72	0,4	1,79	1,51	0,84	1,43	0,61	0,43
K7	1,80	0,39	0,22	1,98	0,46	0,23	0,36	0,31	0,86	2,17	0,12	0,06
K8	0,25	0,18	0,72	0,18	0,09	0,5	5,22	1,58	0,3	0,78	0,20	0,26
K9	*	*	*	*	*	*	3,13	2,30	0,73	0,99	0,31	0,31
S1	*	*	*	*	*	*	1,57	1,24	0,79	0,77	1,46	1,9
S2	0,89	0,53	0,6	0,69	0,40	0,58	2,79	1,35	0,48	1,28	0,46	0,36
S3	1,28	0,42	0,33	0,68	0,48	0,71	1,83	1,40	0,77	0,86	0,28	0,33
S4	*	*	*	*	*	*	4,43	2,24	0,51	0,74	0,42	0,57
S5	0,70	0,52	0,74	0,90	0,48	0,53	*	*	*	*	*	*
S6	2,00	1,67	0,84	0,94	0,26	0,28	1,28	0,49	0,38	1,6	0,19	0,12

S7	0,88	1,17	1,33	0,54	0,43	0,8	4,27	3,23	0,76	1,1	2,66	2,42
S8	2,00	0,69	0,35	1,04	0,82	0,79	3,17	0,67	0,21	0,83	0,28	0,34
S9	0,36	0,19	0,53	0,34	0,18	0,53	*	*	*	*	*	*

*In der Tabelle sind die Menge der Zellkerne, die zur RNA-Extraktion verwendet wurde (NeuN +: Neuronale Zellkerne; NeuN -: Gliale Zellkerne), die extrahierte RNA-Menge, sowie die normalisierte RNA-Menge (norm.: RNA-Menge [pg] pro Zellkern) je Proband (K: Kontrollfall; S: Schizophrener Proband; *: Nicht untersucht) zusammengefasst.*

Tabelle 5.6: RNA-Menge** und RIN- Werte

Fall	Brodmann-Areal 10		Brodmann-Areale 17/18	
	RNA ** [µg]	RIN	RNA ** [µg]	RIN
K1	5,02	2,8	*	*
K2	5,69	5,8	*	*
K3	6,01	4,3	5,64	2,6
K4	*	*	9,83	2,3
K5	2,75	3,5	7,66	2,0
K6	4,29	2,5	5,59	2,1
K7	3,80	2,8	6,21	2,7
K8	4,48	4,5	9,36	3,3
K9	*	*	8,03	3,2
S1	*	*	6,15	2,4
S2	9,09	3,9	6,34	2,2
S3	5,23	4,0	8,72	2,9
S4	*	*	9,30	2,2
S5	3,80	5,4	*	*
S6	7,71	6,4	5,32	3,4
S7	4,96	2,3	5,74	2,8
S8	6,81	6,1	6,00	3,1
S9	5,96	2,6	*	*

*Die Tabelle fasst die RNA-Menge (**: Extrahiert aus Kortexgewebe) und die gemessenen RIN-Werte je Proband (K: Kontrollfall; S: Schizophrener Proband; *: Nicht untersucht) zusammen.*

5.4 DNA-Methylierung am Intron 7 des FKBP5-Gens

Tabelle 5.7: Methylierung des FKBP5-Gens (Intron 7; 2. GRE) in den neuronalen Zellkernen des Brodmann-Areals 10

Region	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	
K1	-	m	-	m	m	-	-	m	-	m	-	-	-	-	m	m	-	-	m	-	-	-	-	-	-	-	m	-	-	m	-	-
K2	-	m	-	m	m	-	-	m	-	m	-	-	-	-	m	m	-	-	m	-	-	-	-	-	-	-	m	-	-	m	-	-
K3	-	m	-	m	m	-	-	m	-	m	-	-	-	-	m	m	-	-	m	-	-	-	-	-	-	-	m	-	-	m	-	-
K4	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
K5	-	m	-	m	m	-	-	m	-	m	-	-	-	-	m	m	-	-	m	-	-	-	-	-	-	-	m	-	-	m	-	-
K6	-	m	-	m	m	-	-	m	-	m	-	-	-	-	m	m	-	-	m	-	-	-	-	-	-	-	m	-	-	m	-	-
K7	-	m	-	m	m	-	-	m	-	m	-	-	-	-	m	m	-	-	m	-	-	-	-	-	-	-	m	-	-	m	-	-
K8	-	m	-	m	m	-	-	m	-	m	-	-	-	-	m	m	-	-	m	-	-	-	-	-	-	-	m	-	-	m	-	-
K9	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
S1	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
S2	-	m	-	m	m	-	-	m	-	m	-	-	-	-	m	m	-	-	m	-	-	-	-	-	-	-	m	-	-	m	-	-
S3	-	m	-	m	m	-	-	m	-	m	-	-	-	-	m	m	-	-	m	-	-	-	-	-	-	-	m	-	-	m	-	-
S4	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
S5	-	m	-	m	m	-	-	m	-	m	-	-	-	-	m	m	-	-	m	-	-	-	-	-	-	-	m	-	-	m	-	-
S6	-	m	-	m	m	-	-	m	-	m	-	-	-	-	m	m	-	-	m	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	m	-	-

5 Anhang

S7	-	m	-	m	m	-	-	m	-	m	-	-	-	-	m	m	-	-	m	-	-	-	-	-	-	-	-	-	m	-	-	
S8	-	m	-	m	m	-	-	m	-	m	-	-	-	-	m	m	-	-	m	-	-	-	-	-	-	-	-	-	m	-	-	
S9	-	m	-	m	m	-	-	m	-	m	-	-	-	-	m	m	-	-	m	-	-	-	-	-	-	-	m	-	-	m	-	-

Die Tabelle stellt die Methylierung (m= methyliert; - = nicht methyliert) aller Cytosin-Basen (C) der Ausgangssequenz dar. Die Cytosin-Basen der CpGs sind hellblau unterlegt.

*K: Kontrollfall; S: Schizophrener Proband; *: Nicht untersucht*

Tabelle 5.8: Methylierung des FKBP5-Gens (Intron 7; 2. GRE) in den neuronalen Zellkernen der Brodmann-Areale 17/18

Region	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	
K1	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
K2	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
K3	-	m	-	m	m	-	-	m	-	m	-	-	-	-	m	m	-	-	m	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	m	-	-
K4	-	m	-	m	m	-	-	m	-	m	-	-	-	-	m	m	-	-	m	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	m	-	-
K5	-	m	-	m	m	-	-	m	-	m	-	-	-	-	m	m	-	-	m	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	m	-	-
K6	-	m	-	m	m	-	-	m	-	m	-	-	-	-	m	m	-	-	m	-	-	-	-	-	-	-	m	-	-	m	-	-
K7	-	m	-	m	m	-	-	m	-	m	-	-	-	-	m	-	-	-	m	-	-	-	-	-	-	-	m	-	-	m	-	-
K8	-	m	-	m	m	-	-	m	-	m	-	-	-	-	m	-	-	-	m	-	-	-	-	-	-	-	m	-	-	m	-	-
K9	-	m	-	m	m	-	-	m	-	m	-	-	-	-	m	m	-	-	m	-	-	-	-	-	-	-	m	-	-	m	-	-
S1	-	m	-	m	m	-	-	m	-	m	-	-	-	-	m	m	-	-	m	-	-	-	-	-	-	-	m	-	-	m	-	-
S2	-	m	-	m	m	-	-	m	-	m	-	-	-	-	m	m	-	-	m	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	m	-	-
S3	-	m	-	m	m	-	-	m	-	m	-	-	-	-	m	-	-	-	m	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	m	-	-
S4	-	m	-	m	m	-	-	m	-	m	-	-	-	-	m	-	-	-	m	-	-	-	-	-	-	-	m	-	-	m	-	-
S5	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
S6	-	m	-	m	m	-	-	m	-	m	-	-	-	-	m	m	-	-	m	-	-	-	-	-	-	-	m	-	-	m	-	-
S7	-	m	-	m	m	-	-	m	-	m	-	-	-	-	m	m	-	-	m	-	-	-	-	-	-	-	m	-	-	m	-	-
S8	-	m	-	m	m	-	-	m	-	m	-	-	-	-	m	-	-	-	m	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	m	-	-

S9 *

*K: Kontrollfall; S: Schizophrener Proband; *: Nicht untersucht*

Tabelle 5.9: Methylierung des FKBP5-Gens (Intron 7; 2. GRE) in den glialen Zellkernen des Brodmann-Areals 10

Region	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	
K1	-	-	-	m	-	-	-	-	-	m	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	m	-	-
K2	-	-	-	m	-	-	-	-	-	m	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	m	-	-
K3	-	-	-	m	-	-	-	-	-	m	-	-	-	-	m	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	m	-	-
K4	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
K5	-	m	-	m	-	-	-	-	-	m	-	-	-	-	m	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	m	-	-
K6	-	-	-	m	-	-	-	-	-	m	-	-	-	-	m	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	m	-	-
K7	-	-	-	m	-	-	-	-	-	m	-	-	-	-	m	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	m	-	-
K8	-	-	-	m	-	-	-	-	-	m	-	-	-	-	m	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	m	-	-
K9	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
S1	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
S2	-	-	-	m	-	-	-	-	-	m	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	m	-	-
S3	-	m	-	m	-	-	-	-	-	m	-	-	-	-	m	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	m	-	-
S4	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
S5	-	-	-	m	-	-	-	-	-	m	-	-	-	-	m	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	m	-	-
S6	-	-	-	m	-	-	-	-	-	m	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	m	-	-
S7	-	-	-	m	-	-	-	-	-	m	-	-	-	-	m	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	m	-	-
S8	-	-	-	m	-	-	-	-	-	m	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	m	-	-

5 Anhang

[illegible]

Die Tabelle stellt die Methylierung (m= methyliert; - = nicht methyliert) aller Cytosin-Basen (C) der Ausgangssequenz dar. Die Cytosin-Basen der CpGs sind hellblau unterlegt.

*K: Kontrollfall; S: Schizophrener Proband; *: Nicht untersucht*

Tabelle 5.10: Methylierung des FKBP5-Gens (Intron 7; 2. GRE) in den glialen Zellkernen der Brodmann-Areale 17/18

Region	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
K1	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
K2	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
K3	-	-	-	m	-	-	-	-	-	m	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	m	-	-
K4	-	-	-	m	-	-	-	-	-	m	-	-	-	-	m	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	m	-	-
K5	-	-	-	m	-	-	-	-	-	m	-	-	-	-	m	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	m	-	-
K6	-	m	-	m	-	-	-	-	-	m	-	-	-	-	m	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	m	-	-
K7	-	-	-	m	-	-	-	-	-	m	-	-	-	-	m	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	m	-	-
K8	-	-	-	m	m	-	-	-	-	m	-	-	-	-	m	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	m	-	-
K9	-	m	-	m	-	-	-	-	-	m	-	-	-	-	m	m	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	m	-	-
S1	-	-	-	m	-	-	-	-	-	m	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	m	-	-
S2	-	-	-	m	-	-	-	-	-	m	-	-	-	-	m	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	m	-	-
S3	-	-	-	m	-	-	-	-	-	m	-	-	-	-	m	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	m	-	-
S4	-	-	-	m	-	-	-	-	-	m	-	-	-	-	m	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	m	-	-
S5	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
S6	-	-	-	m	-	-	-	-	-	m	-	-	-	-	m	m	-	-	m	-	-	-	-	-	-	-	-	-	m	-	-
S7	-	-	-	m	-	-	-	-	-	m	-	-	-	-	m	-	-	-	m	-	-	-	-	-	-	-	-	-	m	-	-
S8	-	-	-	m	-	-	-	-	-	m	-	-	-	-	m	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	m	-	-

5 Anhang

S9 *

Die Tabelle stellt die Methylierung (m= methyliert; - = nicht methyliert) aller Cytosin-Basen (C) der Ausgangssequenz dar. Die Cytosin-Basen der CpGs sind hellblau unterlegt.

*K: Kontrollfall; S: Schizophrener Proband; *: Nicht untersucht*

5.5 Expressionsanalyse von 90 ncRNAs: Gemessene Cq-Werte

Tabelle 5.11: Gemessene Cq-Werte in den neuronalen Zellkernen des Brodmann-Areals 10

ncRNA	K1	K2	K3	K5	K6	K7	K8	S2	S3	S5	S6	S7	S8	S9
21A	19,54	22,01	22,76	22,87	24,1	23,47	20,47	23,9	22,39	22,12	22,74	24,87	23,77	19,84
7SK	26,18	26,55	24,82	28,68	30,2	28,71	24,46	27,95	28,24	26,14	27,03	33,89	29,02	27,18
7SL	24,03	26,05	25,68	25,82	23,98	24,8	23,73	29,05	27,19	25,89	27,23	35,45	29,62	23,24
Air	32,27	33,23	31,82	32,67	36,72	34,91	30,51	32,53	32,71	31,58	32,6	41	35,71	31,53
AK023948	32,7	33,67	34,01	35,89	34,51	36,82	31,94	35,73	34,2	32,32	34,5	37,6	37,05	32,87
Alpha 280	33,45	35,68	38,08	35,7	32,73	36,72	36,69	41	35,95	41	41	34,62	41	33,45
Alpha 250	31,53	32,63	41	41	41	41	30,26	41	41	41	32,12	36,68	41	30,26
ANRIL	33,69	34,82	35	41	37,7	39,41	36,35	38,79	38,41	35,66	35,95	41	41	32,42
anti-NOS2A	32,05	33,86	34,95	33,26	32,05	36	35,34	39,34	36,47	41	41	32,9	36,37	30,62
antiPeg11	36,07	33,15	35,47	33,12	33,99	33,3	35,73	36,58	32,98	33,75	33,69	34,95	33,5	32,59
BACE1AS (family)	33,11	34,09	31,74	34,65	36,61	35,68	30,66	35,21	34,81	32,71	33,55	41	36,5	32,5
BC200	23,91	25,12	25,83	26,88	28,57	28,82	22,28	27,29	24,9	24,67	26,45	26,11	24,57	24,28
CAR Intergenic 10	33,97	35,86	33,51	36,68	36,43	37,41	32,72	37,32	36,67	35,45	36,41	41	36,4	32,02
DHFR upstream transcripts (family)	30,95	32,3	32,16	33,56	35,62	35,08	29,18	34,74	34,02	32,84	34,71	36,65	37,59	30,16
Dio3os (family)	28,06	30,64	29,62	32,95	31,93	31,94	27,84	33,42	30,8	29,48	31,16	36,81	34,05	28,88
DISC2 (family)	33,44	34,14	34,21	35,73	36,26	37,62	32,05	34,68	36,39	33,97	35,68	41	41	32,86

5 Anhang

DLG2AS (family)	33,07	34,63	41	36,15	41	36,48	32,3	41	41	41	41	34,55	39,38	31,59
E2F4 antisense	30,93	33,43	36,68	32,77	31,31	35,24	35,94	37,32	41	41	41	32,82	36,4	29,63
EgoA	29,27	29,1	30,54	32,19	30,63	33,54	28,5	33,86	31,41	30,66	32,16	36,96	34,11	27,3
EGO B	29,44	29,18	31,15	32,57	30,41	32,68	28	33,29	30,58	30,19	32,08	36	34,81	26,81
Emx2os	31,78	32,32	31,44	33,78	37,78	35,11	29,46	34,63	33,75	31,32	34,21	36,39	34,43	30,02
Evf1 und EVF2	34,44	37,55	41	41	41	41	41	41	41	41	41	35,49	41	33,75
GAS5-family	25,66	27,08	24,03	27,99	29,55	28,06	24,25	26,85	26,57	25,06	25,92	33,24	28,58	27,3
Gomafu	33,06	34,56	32,01	34,49	35,52	35,75	30,84	33,76	34,03	33,92	34,79	37,75	36,98	30,59
H19	32,91	34,48	31,79	36,69	36,79	35,19	32,57	35,13	37,45	32,19	35,24	41	36,12	32,65
H19 antisense	31	29,12	29,62	30,88	29,43	30,53	28,73	31,04	30,61	28,81	32,12	35,58	34,07	25,88
H19 upstream conserved 1 & 2	26,89	26,67	27,11	28,76	26,12	26,72	25,65	29,19	28,7	26,57	29,03	33	29,88	24,44
HAR1A	34,62	32,52	34,06	33,15	34,81	33,91	31,47	34,54	34,58	32,32	35,69	38,09	37,89	31,45
HAR1B	29,5	29,57	30,11	30,02	30,11	31,68	28,67	32,1	30,95	29,45	30,95	32,5	31,71	27,04
HOTAIR	32,98	30,28	35,1	34,32	34,59	33,26	31,17	34,06	33,72	32,97	32,66	36,39	33,65	32,79
HOTAIRM1	30,77	31,11	30,52	32,52	33,04	32,59	28,88	34,27	31,55	29,5	31,67	35,12	32,25	29,86
HOTTIP	37,79	29,03	34,59	37,96	39,44	37,61	33,03	38,14	36,11	34,6	37,84	41	38,38	34,85
Hoxa1 las	28,06	31,27	28,41	30,58	32,99	32,47	27,7	31,5	32,21	29,62	31,79	37,96	32,79	29,86
HOXA3as	38,48	37,62	35,31	41	41	37,89	35,81	37,67	37,2	36,85	41	41	38,8	36,8
HOXA6as	26,1	26,29	27,62	26,84	30,94	29,95	24,08	31,02	25,59	26,99	28,83	36,69	30,49	27,61
HULC	35,92	35,62	32,65	34,64	36,77	35,92	33,03	34,57	34,42	32,94	34,12	41	36,75	35,03
IGF2AS (family)	31,44	31	30,3	32,62	32,22	32,43	31,21	31,67	33,2	29,72	32,68	35,56	35,44	30,89

IPW	36,15	33,88	34,48	33	35,16	34,7	33,4	34,59	34,62	31,45	35,89	41	37,69	32,45
Jpx	38,99	35,19	35,08	36,55	37,15	36,78	33,45	36,88	35,59	33,04	36,12	41	36,71	33,76
Kcnq1ot1	38,61	34,64	33,15	36,83	41	36,78	31,95	33,24	35,56	34,08	35,22	41	36,99	33,46
KRAS P1	34,9	34,43	33,07	34,57	37,24	35,81	32,23	34,48	35,54	32,52	34,47	41	35,98	31,91
L1PA16	32,28	34,47	41	35,11	33,91	34,09	34,99	38,36	37,58	41	41	32,86	35,71	29,76
lincRNA-p21	31,49	32,73	29,49	31,45	33,97	31,7	30,47	33,11	32,21	30	31,18	36,86	32,82	32,02
lincRNA-RoR	31,41	31,21	34,09	32,88	31,31	33,02	31,79	34,6	33,93	33,29	35,11	31,26	33,18	30,16
lincRNA-SFMBT2	34,82	41	37,12	34,56	34,21	33,76	41	41	36,64	41	34,67	35,57	36,13	33,19
lincRNA-VLDLR	30,19	28,56	31,04	28,52	30,95	31,53	30,76	31,94	31,86	31,14	31,32	29,48	29,5	30,09
LOC285194	33,72	34,55	32,89	34,76	36,98	36	31,95	36,91	34,89	34,02	35,55	39,04	35,85	33,41
LUST	24,97	26,17	24,49	28,83	28,06	28,04	23,31	26,27	25,91	25,05	25,99	33,85	28,78	24,72
Malat1	33,09	32,08	30,92	34,09	39,5	33,59	30,46	35,06	34,06	30,28	34,26	34,93	35,6	33,23
masRNA	37,75	33,79	31,63	34,31	35,3	34,59	32,1	33,16	33,11	30,84	33,87	38,36	36,09	33,41
MEG3 (family)	38,19	37,71	34,95	41	38,54	38,52	34,52	37,77	36,26	34,59	36,85	41	41	35,52
MEG9	31,65	28,52	31,26	29,77	31,47	30,61	27,4	31	31,24	29,04	30,92	41	32,78	27,19
MER11C	32,55	31,29	31,68	32,88	33,84	34,92	29,77	33,67	33,72	30,64	32,72	37,4	33,58	33,89
ncR-uPAR	25,29	27,02	27,1	27,86	28,6	28,08	25,63	27,26	25,97	27,07	27,66	31,48	27,58	23,85
NDM29	29,06	30,45	30,6	27,7	29,57	30,71	30,4	33,43	29,29	29,9	30,93	41	31,88	28,28
NEAT1 (family)	33,51	32,64	32,52	34,42	34,08	34,6	29,91	35,02	33,32	32,05	33,85	37,1	36,99	30,78
Nespas	32,19	33,24	34,49	33,98	37,29	37,87	30,45	36,79	34,82	33,55	35,52	38,65	36,55	31,18
NRON	33,08	32,3	32,14	31,94	34,4	35,67	30,18	35,54	33,75	33,03	36,56	38,34	33,95	30,25

5 Anhang

NTT	33,57	34,44	33,75	35,82	37,05	37,12	32,19	41	35,88	35,2	36,2	41	36,94	32,19
p53 mRNA	35,66	34,03	33,4	35,58	41	37,57	31,1	34,97	34,42	33,12	35,31	41	35,88	32,87
PCGEM1	35,55	34,65	34,67	34,92	36,82	34,45	32,84	37,71	36,8	33,1	35,45	41	37,01	32,94
PR antisense transcripts	41	34,75	37,58	38,5	38,91	39,41	35,18	38,46	37,47	37,32	41	41	39,06	41
PRINS	36,98	34,3	36,6	37,36	41	41	33,43	37,44	37,15	35,43	39,02	41	37,13	35,48
PSF inhibiting RNA	42,12	38,14	37,17	41	41	41	36,37	36,86	41	37,18	41	41	41	36,42
PTENP1	37,1	34,63	36,94	37,9	41	41	34,74	41	38,96	34,79	37,77	41	38,16	35,87
RNCR3	32,24	32,98	32,07	33,4	33,98	33,62	30,79	32,92	32,3	33,18	33,49	37,12	34,12	30,32
SAF	33,97	34,76	34,3	34,46	41	38,14	33,09	41	36,8	33,64	36,51	38,36	35,77	33,94
SCA8	35,6	34,19	33,05	35,96	37,06	35,64	31,83	36,81	35,44	33,01	35,55	39,36	37,65	33,41
snaR	31,31	33,14	32,97	31,83	32,83	33,69	30,05	34,65	31,71	31,01	33,67	36,82	34,58	30,48
SNHG1	33,31	32,86	32,06	33,22	36,47	35,64	30,09	33,85	34,21	33,25	35,44	37,92	34,67	31,95
SNHG3	27,72	29,6	28,87	28,58	29,55	29,13	26,89	32,14	29,52	29,06	29,5	34,65	31,85	27,28
SNHG4	24,95	27,59	25,28	28,22	28,46	27,14	23,23	26,12	26,21	24,47	25,85	34,13	28,69	26,53
SNHG5	41	41	37,33	41	37,62	41	41	38,71	39,29	35,53	37,21	41	41	41
SNHG6	37,24	32,84	33,87	34,01	34,44	33,94	31,44	33,19	33,18	31	35,25	37,33	35,69	31,25
Sox2ot	38,76	37,51	36,86	37,27	41	37,07	35,73	37,75	36,02	34,84	39,01	41	39,1	36,07
SRA	40,19	32,46	33,86	35,52	36,51	37,12	32,64	35,89	35,57	32,46	35,99	36,72	36,94	33,94
ST7OT	35,08	34,52	33,64	35,49	33,64	35,64	32,71	35,47	33,47	32,31	34,48	37,8	35,68	32,52
TEA ncRNAs (family)	33,97	34,29	35,82	36,94	38,88	36,63	32,02	36,05	34,91	35,73	36,68	38,03	36,73	31,81
Tmevpg1	32,88	32,76	31,69	35,02	36,84	36,49	30,66	36,02	34,06	32,47	34,94	38,02	35,29	30,78

TncRNA	33,44	33,12	32,27	34,87	35,95	34,59	30,81	36,04	33,44	32,71	35,07	37,18	36,97	31,04
Tsix	30,08	29	31,22	30,22	30,24	31,53	24,76	32,98	29,47	29,44	32,72	36	33,03	24,87
TUG1 (family)	34,98	34,95	35,88	34,27	36,94	35,88	32,84	39,17	35,46	35,48	38,55	41	36,47	34,02
UCA1	36,54	36,08	35,58	37,64	41	41	33,77	38,15	38,21	41	36,75	41	37,19	35,76
UM9-5	34,56	34,6	33,01	33,7	35,22	34,19	31,43	34,05	33,24	32,08	34,57	41	36,43	31,97
WT1-AS	35,93	35,65	36,4	36,53	37,04	36,51	32,29	36,69	35,69	33,15	35,08	41	41	33,64
Xist	36,76	34,06	33,96	34,57	36,63	34,54	31,89	34,16	34,28	31,74	35,13	41	36,9	32,5
Y RNA-1	28,92	27,97	27,94	27,1	24,97	25,08	27,08	26,6	25,71	25,67	26,86	30,91	26,83	27,29
Zeb2NAT	34,18	32,03	32,55	34,77	31,1	34,19	30,22	34,41	32,7	32,56	34,09	41	35,69	27,72
Zfas1	34,72	33,98	34,62	37,17	34,55	34,94	32,7	37,08	34,1	33,58	35,31	41	35,79	30,08
Zfx2as	22,27	23,26	24,77	26,02	26,03	25,73	21,28	25,63	22,51	23,99	24,57	38,22	25,08	41
18S rRNA	24,09	23,09	22,82	24,14	25,44	22,99	21	28,21	23,08	24,17	22,81	26,87	25,12	19,62
RNU43 (snoRNA)	26,8	26,41	27,7	27,87	28,92	28,03	25,12	31,18	27,88	26,71	28,06	34,7	31,73	24,85
GAPDH	32,13	31,51	32,65	33,79	36,44	34,69	29,45	36,45	31,91	32,05	34,48	37,43	35,51	30,78
LAMIN A/C	37,13	37,66	36,49	38,14	41	41	34,19	41	38,39	36,07	37,09	41	37,28	35,73
U6 snRNA	25,49	26,2	24,44	25,92	28,9	27,74	23,76	27,42	26,83	25,68	25,68	32,42	28,48	26,03

Die Tabelle fasst die gemessenen Cq-Werte aller Probanden (K: Kontrollfall; S: Schizophrener Proband) zusammen. Die ncRNAs mit statistisch signifikantem Expressionsunterschied in der vorliegenden Arbeit sind gelb unterlegt. Die ncRNAs, die in der Literatur mit der Erkrankung Schizophrenie assoziiert wurden, sind blau unterlegt.

Tabelle 5.12: Gemessene Cq-Werte in den neuronalen Zellkernen der Brodmann-Areale 17/18

ncRNA	K1	K5	K6	K7	K8	K9	K4	S2	S7	S8	S3	S6	S4	S1
21A	24,79	25,43	24,89	27,66	20,26	21,08	25,47	23,59	19,01	21,69	22,57	24,95	19,57	24,89
7SK	27,28	33,41	31,15	33,73	25,24	27,67	28,8	27,25	22,91	27,97	28,87	30,42	26,88	32
7SL	25,99	27,28	25,69	27,09	22,75	24,62	27,73	27,4	22,09	25,47	27,07	28,83	22,45	30,86
Air	33,01	35,06	36,89	41	29,67	34,57	41	37,61	29,05	32,96	35,8	41	30,59	41
AK023948	33,69	36,58	36,41	41	31,06	33,58	37,35	37,96	29,93	33,82	36,92	37,6	31,55	38,11
Alpha 280	41	31,26	30,91	30,16	34,71	37,29	32,75	41	32,87	37,1	37,49	36,69	36,21	39,39
Alpha 250	34,19	35,55	34,31	37,62	29,71	33,85	37,92	35,86	28,6	31,81	30,86	35,91	30,98	36,05
ANRIL	37,36	41	41	41	34,72	41	41	41	31,08	37,04	41	41	36,04	41
anti-NOS2A	35,75	29,88	29,96	29,58	33,57	36,03	36,92	38,36	30,81	38,61	37,32	35,08	35,72	41
antiPeg11	36,43	35,54	35,55	34,63	35,03	35,49	34,72	34,96	35,68	34,89	36,76	34,48	35,93	36,44
BACE1AS (family)	36,43	37,36	41	41	33,1	36,72	34,84	37,64	30,07	35,3	35,74	41	33,93	41
BC200	25,46	31,28	30,88	35,42	24,53	27,86	27,19	29,15	22,99	27,77	26,4	29,09	25,75	31,08
CAR Intergenic 10	38,66	41	41	41	33,51	38,54	41	36,45	31,29	36,46	41	38,87	33,6	41
DHFR upstream transcripts (family)	34,97	37,18	41	41	35,61	41	36,6	34,27	28,66	33,28	41	36,16	36,67	37,11
Dio3os (family)	32,42	32,76	33,17	36,21	28,46	31,07	33,13	31,87	26,76	30,29	33,4	33,66	28,44	38,23
DISC2 (family)	35,04	37,62	37,28	41	32,14	35,82	41	36,14	30,82	35,18	41	37,93	34,04	41
DLG2AS (family)	41	29,6	30,59	30,32	33,57	36,14	41	41	31,73	37,77	36,78	41	36,46	41
E2F4 antisense	36,71	34	34,58	28,71	34,06	35,57	36,04	35,6	30,17	41	41	34,9	41	35,2

EgoA	32,11	32,3	31,67	31,27	23,99	29,86	32,72	31,52	26,11	29,5	27,68	33,83	26,73	32,45
EGO B	31,95	32,71	32,26	32,43	24,2	30,4	32,5	33,86	26,31	29,05	29,94	33,43	27,25	32,5
Emx2os	31,99	34,67	37,6	38,21	29,74	33,65	33,14	34,96	27,96	33,46	34,67	36,43	31,43	36,56
Evf1 und EVF2	41	34,65	41	34,8	41	41	41	41	36,56	41	41	41	41	41
GAS5-family	29,27	29,86	31,19	32,94	25,9	30,58	28,15	31,44	24,1	28,55	27,6	31,1	25,98	33,43
Gomafu	34,03	36,49	36,92	41	31,73	35,55	34,96	37,24	30,16	33,65	32,94	37,32	31,47	41
H19	36,74	36,16	36,75	41	37,93	34,65	41	35,43	29,83	34,92	36,01	38,16	30,71	41
H19 antisense	30,22	30,19	29,51	34,79	29,57	29,88	34,14	32,07	26,16	30,52	30,62	33,66	27,17	34,93
H19 upstream conserved 1 & 2	27,61	27,56	27,2	29,63	24,27	26,66	30,42	29,96	22,73	26,74	27,21	30,06	23,11	30,87
HAR1A	34,01	35,69	34,83	39,37	28,08	34	37,64	34,98	30,08	33,46	33,14	36,08	31,07	36,74
HAR1B	30,98	31,05	30,72	33,76	24,82	30,76	32	31,25	25,9	30,78	29,47	32,71	27,41	33,16
HOTAIR	41	41	41	34,58	41	41	35,6	35,76	32,54	31,2	41	35,51	41	34,42
HOTAIRM1	33,82	34,7	34,01	36,51	29,04	32,25	33,06	33,86	28,06	32,21	31,41	35,41	31,16	36,51
HOTTIP	36,76	37,85	41	41	31,95	36,86	36,59	41	32,29	36,54	37,07	41	34,54	41
Hoxa11as	31,64	30,51	32,9	34	28,26	31,41	31,09	35,8	26,76	31,19	35,92	34,24	28,72	34,57
HOXA3as	37,47	41	41	41	35,45	37	41	41	34,1	41	41	41	37,31	41
HOXA6as	29,51	34,46	33,26	35,53	20,58	27,94	31,99	28,67	24,15	28,4	24,78	29,82	23,6	29,63
HULC	36,45	36,98	38,22	41	32,73	35,83	38,75	41	32,02	36,68	34,19	39,05	32,72	41
IGF2AS (family)	33,81	34,3	32,4	37,21	31,08	32,43	41	41	28,42	32,56	32,19	41	29,07	41
IPW	33,58	37,44	41	41	33,6	34,48	37,26	34,66	30,26	34,61	35,14	36,54	31,86	41
Jpx	41	41	41	38,03	41	41	37,33	41	30,7	37,13	41	38,34	41	41

5 Anhang

Kcnq1ot1	34,18	34,43	36,05	39,33	30,47	33,87	37,15	36,51	29,98	35,28	35,84	38,06	31,79	41
KRAS P1	33,67	35,79	35,9	41	30,68	35,04	41	35,61	29,64	35,11	33,42	38,15	31,68	38,51
L1PA16	35,85	28,43	29,22	28,14	32,68	34,6	35,03	36,28	32	37,01	35	35,14	35,74	36,14
lincRNA-p21	34,44	34,91	32,93	34,7	29,43	32,28	32,88	34,58	28,94	33,45	30,96	34,67	29,62	36,38
lincRNA-RoR	34,54	29,15	29,56	29,31	31,08	33,5	34,05	33,58	29,72	30,29	34,44	32,63	36,66	32,59
lincRNA-SFMBT2	39,98	31,16	30,67	30,78	32,63	35,45	36,69	35,62	33,5	41	36,39	34,02	35,99	38
lincRNA-VLDLR	32,86	29,7	29,62	28,83	30,93	32,47	29,64	29,41	30,29	29,67	32,65	28,98	32,85	29,71
LOC285194	33,99	36,54	36,4	41	30,93	34,56	35,57	38,52	31,02	35,81	33,76	37,72	33,07	41
LUST	27,15	30,06	28,57	34,57	24,29	26,63	25,49	30,22	22,82	26,66	26,2	31,62	23,99	28,67
Malat1	31,73	41	37,31	41	32,62	32,07	36,68	31,94	27,75	33,15	32,27	35,98	28,4	37,95
masRNA	32,73	34,77	35,08	41	31,62	33,15	37,15	35,55	29,96	34,15	33,45	36,44	30,01	38,05
MEG3 (family)	36,07	37,29	41	41	32,61	36,49	41	41	34,51	37,04	35,09	41	32,03	41
MEG9	28,78	32,82	31,9	41	24,95	28,79	41	41	26,54	29,04	27,89	41	27,62	41
MER11C	31,56	34,47	33,75	39,26	29,3	32,22	34,55	34,53	28,23	32,57	31,29	34,82	29,21	37,31
ncR-uPAR	29,12	28,08	28,23	35,05	23,65	25,63	27,77	35,7	24,23	27,46	26,3	31,52	23,93	32,3
NDM29	41	41	41	31,02	41	41	35,78	34,42	26,07	32,22	41	33,79	41	34,08
NEAT1 (family)	32,45	35,55	35,01	38,48	26,69	32,19	34,83	35,72	28,73	33,49	31,23	35,18	28,75	36,52
Nespas	32,41	35,51	34,95	36,98	29,27	32,82	34,6	35,74	29,52	34,47	32,72	36,73	29,89	39,04
NRON	31,74	33,83	35,99	38,92	28,86	31,06	41	36,71	29,75	33,16	31,89	41	29,57	36,84
NTT	34	35,61	35,62	41	30,23	35,56	41	39,38	31,45	35,95	33,04	38,42	32,54	41
p53 mRNA	33,06	35,41	37,73	41	31,47	33,56	36,06	37,68	30,64	35,07	33,74	41	31,17	41

PCGEM1	34,83	41	36,8	41	33,22	34,06	41	36,38	30,83	35,29	33,52	37,71	31,85	39,13
PR antisense transcripts	34,89	35,6	41	41	34,56	38,69	41	41	34,45	36,85	41	41	35,21	41
PRINS	34,59	41	41	41	32,91	36,13	38,9	37,27	31,48	36	34,9	41	32,86	41
PSF inhibiting RNA	37,22	41	41	41	34,25	39,12	41	41	34,68	41	41	41	36,43	41
PTENP1	35,44	41	37,14	41	34,05	38,85	41	41	32,49	35,57	36,8	41	33,98	41
RNCR3	32,21	33,76	34,22	41	29,86	31,62	34,08	38,49	29,08	33,13	34,42	36,44	31,54	37,84
SAF	35,83	36,43	36,93	41	32,58	34,72	36,54	37,98	30,9	36,12	35,06	37,22	32,69	41
SCA8	34,07	36,73	41	41	29,16	34,14	35,75	37,67	30,72	34,48	32,62	36,68	31,15	41
snaR	33,65	34,22	32,94	36,75	27,76	31,52	34,63	37	28,54	31,29	31,77	37,22	29,94	38,63
SNHG1	33,24	35,13	36,79	38,44	30,5	32,49	35,07	37,69	29,7	33,12	33,58	36,48	31,1	39,14
SNHG3	29,15	32,22	30,83	37	25,89	28,87	31,23	33,05	26,54	29,08	27,47	32,62	28,14	32,8
SNHG4	27,23	30,45	30,07	33,69	25,52	27,02	27,53	30,06	23,47	27	27,09	29,85	24,19	32,07
SNHG5	41	41	41	41	34,17	41	41	41	41	41	38,69	41	34,72	41
SNHG6	31,87	35,92	35,63	41	30,79	33,93	37,36	35,23	29,25	33,12	34,74	37,19	30,13	38,44
Sox2ot	36,59	41	41	41	33,75	36,92	41	37,63	32,7	37,8	36,68	41	34,76	41
SRA	33,58	36,03	41	41	31,06	34,82	38,72	35,61	30,4	35,72	34,65	36,7	32,8	41
ST7OT	33,69	36,6	34,31	41	30,79	38,51	37,43	34,96	30,07	35,19	35,43	36,62	30,94	37,93
TEA ncRNAs (family)	34,44	36,05	37,38	41	31,57	35,11	36,51	41	31,83	33,96	36	39,23	33,29	41
Tmevpg1	36,15	36,89	38,43	41	31,82	35,05	34,25	36,78	29,57	33,95	33,66	38,71	31,68	41
TncRNA	33,63	37,87	38,82	41	28,93	34,44	35,21	41	29,64	33,5	34,53	37,01	31,25	37,88
Tsix	29,84	32,08	29,95	33,62	24,8	30,99	34,24	33,65	26,07	29,27	30,43	33,07	28,64	36,53

5 Anhang

TUG1 (family)	35,72	35,82	37,69	41	32,99	36,03	35,65	37,84	31,48	33,93	36,91	36,84	34,5	37,95
UCA1	35,66	39,55	41	41	34,08	41	38,55	41	32,62	36,62	37,72	41	35,08	41
UM9-5	33,32	36,19	39	41	30,93	34,43	35,05	37,11	30,42	34,58	34,55	37,06	41	37,05
WT1-AS	36,6	41	41	41	33,69	35,06	41	38,08	30,67	34,75	36,88	39,18	33,6	41
Xist	32,99	35,81	37,08	41	32,86	35,15	41	34,99	30,25	32,97	34,75	37,9	32,49	38,14
Y RNA-1	25,84	25,75	26,05	28,04	25,2	26,8	28,44	41	24,69	26,02	27,16	28,06	24,6	28,44
Zeb2NAT	32,84	32,6	31,83	41	30,08	32,64	37,93	36,27	29,14	33,77	32,98	38,05	30,79	41
Zfas1	34,48	34,79	34,3	41	31,43	36,42	36,74	36,72	30,8	34,22	35,23	39,03	32,55	41
Zfhx2as	27,8	26,11	27,07	41	22,73	24,62	38,76	38,24	21,31	24,11	25,2	41	22,11	41
18S rRNA	26,58	26,1	24,63	24,22	22,72	24,55	27,26	27,02	20,78	24,55	23,69	29,29	21,47	28,54
RNU43 (snoRNA)	29,98	33,44	31,61	37,7	24,03	28,03	31,47	31,96	24,5	28,95	27,8	31,08	25,76	30,76
GAPDH	32,81	34,69	35,96	41	29,32	33,7	34,54	36,75	28,55	32,04	34,81	36,01	31,03	38,3
LAMIN A/C	41	41	41	41	36,38	37,23	41	41	34,6	41	41	41	37,29	41
U6 snRNA	24,55	33,66	29,99	34,02	21,71	25,74	26,9	27,52	22,61	26,1	25,54	28,13	24,08	28,65

Die Tabelle fasst die gemessenen Cq-Werte aller Probanden (K: Kontrollfall; S: Schizophrener Proband) zusammen. Die ncRNAs mit statistisch signifikantem Expressionsunterschied in der vorliegenden Arbeit sind gelb unterlegt. Die ncRNAs, die in der Literatur mit der Erkrankung Schizophrenie assoziiert wurden, sind blau unterlegt.

Tabelle 5.13: Gemessene Cq-Werte in den glialen Zellkernen des Brodmann-Areals 10

ncRNA	K2	K1	K3	K5	K6	K7	K8	S2	S7	S8	S3	S5	S6	S9
21A	22,69	18,82	24,56	23,14	26,8	25,44	24,96	25,16	24,7	24,92	27,14	19,83	24,83	22
7SK	26,97	25,58	28,26	29,13	31,54	31,11	30,89	28,48	29,46	27,91	33,21	23,81	28,66	29,67
7SL	25,71	23,02	27,63	26,46	26,79	26,26	28,77	33,75	29,87	28,22	31,78	23,8	28,45	25,69
Air	34,46	32,3	32,76	34,67	36,47	41	41	33,54	35,84	34,81	41	28,82	34,75	33,53
AK023948	34,89	32,73	35,52	34,57	35,81	41	41	36,69	38,15	36,05	37,79	29,69	35,65	34,53
Alpha 280	33,52	33,65	38,02	35,85	32,94	30,84	35,68	41	36,97	37,22	41	36,85	41	30,12
Alpha 250	33,76	30,82	41	41	41	37,11	35,96	41	41	41	41	28,76	32,76	32,75
ANRIL	32,9	34,98	37,44	41	37,42	41	41	38	41	41	41	34,71	37,98	31,45
anti-NOS2A	32,1	33,16	36,15	33,79	31,9	30,82	34,85	39,17	38,04	38,39	37,47	35,31	34,09	28,54
antiPeg11	36,11	36,5	35,19	34,09	32,96	34,82	35,14	35,1	35,85	33,89	33,23	35,32	33,18	35,34
BACE1AS (family)	35,02	32,72	32,65	34,96	36,11	39,35	37,81	35,93	36,78	36,66	41	29,41	33,87	35,14
BC200	25,61	22,97	28,21	28,84	30,99	28,2	28,95	29,83	29,09	27,46	30,88	25,17	28,65	26,92
CAR Intergenic 10	35,56	34,24	34,86	41	41	41	41	41	37,67	37,11	41	30,44	37,02	34,58
DHFR upstream transcripts (family)	35,46	30,02	35,41	36,24	37,18	37,66	36,48	34,78	36,42	35,86	41	27,67	35,46	33,55
Dio3os (family)	30,27	27,27	31,61	32,67	34,65	34,76	35,41	32,86	33,97	32,12	34,85	25,85	31,98	33,69
DISC2 (family)	35,71	32,58	35,51	34,93	39,41	41	41	36,65	41	36,57	41	29,14	36,81	35,57
DLG2AS (family)	33,81	34,75	37,7	41	35,66	32,6	34,98	41	32,92	38,52	41	35,69	41	31,2
E2F4 antisense	30,81	32,42	34,14	32,91	30,98	29,65	34,9	37,64	41	41	41	33,59	41	27,91

5 Anhang

EgoA	30,95	27,63	32,67	32,86	32,5	29,62	33,68	29,89	33,67	32,57	35,21	34,01	34,07	29,8
EGO B	30,78	27,6	31,51	32,01	32,78	29,95	33,13	31,17	34,62	32,93	35,62	25,19	33,48	29,51
Emx2os	33,82	31,28	33,65	33,89	38,03	36,87	36,95	32,3	34,48	35,12	37,31	27,61	34,5	33,41
Evf1 und EVF2	36,6	41	41	35,61	41	36,52	41	41	41	41	41	41	41	34,81
GAS5-family	28,28	25,44	25,76	27,77	30,53	31,32	30,99	26,87	29,46	28,22	31,01	22,67	26,78	29,12
Gomafu	38,2	32,12	33,69	36,23	37,35	39,28	41	35,09	37,6	36,54	37,44	29,53	35,64	34
H19	35,49	31,88	32,58	34,3	41	37,39	37,88	33,82	37,63	34,28	37,13	28,87	35,77	34,64
H19 antisense	29,51	27,75	31,65	30,98	30,88	30,88	32,95	29,26	34,27	31,06	33,87	25,41	30,83	28,56
H19 upstream conserved 1 & 2	27,17	24,5	28,19	27,6	28,44	28,75	29,48	30,8	31,84	28,71	31,43	23,32	28,43	26,65
HAR1A	41	30,77	33,87	32,28	35,63	36,2	37,02	34,84	38,04	35,04	37,84	29,5	34,83	34,52
HAR1B	31,48	28,59	30,75	29,76	32,62	32,7	31,88	30,98	35,73	32,93	32,87	28,3	31,88	31,56
HOTAIR	33,44	33,04	33,69	33,09	33,01	35,3	34,09	34,59	33,01	35,23	31,13	33,13	36,91	32,72
HOTAIRM1	31,6	31,06	30,72	34,74	35,06	36,43	34,98	32,02	32,24	33,15	35,84	27,1	33,61	32,96
HOTTIP	38,76	36,81	35,57	37,23	41	41	41	37,09	41	41	41	31,12	37,21	36,03
Hoxa11as	31,43	28,69	30,9	31,63	32,58	33,59	34,87	29,97	32,07	33,6	33,73	26,2	31,61	31,6
HOXA3as	39,01	35,8	35,7	38,25	41	41	41	36,71	41	41	37,76	33,25	41	37,83
HOXA6as	29,46	23,99	28,19	25,96	32,23	31,58	31,26	29,75	32,12	30,54	29,66	25,08	31,09	27,96
HULC	41	34,17	33,68	35,74	41	41	41	35,78	34,77	37,3	41	30,85	35,6	36,45
IGF2AS (family)	32,27	30,81	30,22	32,1	34,91	38,81	41	30,8	34,48	31,79	33,66	26,86	32,61	31,89
IPW	35,26	32,7	36,79	35,44	38,97	41	41	34,57	41	35,66	41	30,62	36	35,47
Jpx	41	37,22	34,68	34,96	37,42	41	38,94	37,13	41	35,47	41	30,24	37,71	36,04

Kcnq1ot1	34,9	32,96	33,95	34,58	38,65	41	41	34,89	38,03	37,25	38,49	29,87	35,64	35,81
KRAS P1	34,81	34,22	33,9	34,58	38,22	41	39,5	35	39,43	41	41	30,74	35,97	34,73
L1PA16	32,21	35,65	37,95	33,5	33,97	29,52	33,87	36,57	36,47	37,63	41	33,62	41	30,49
lincRNA-p21	33,71	32,31	30,62	33,95	34,57	33,23	34,32	30,24	32,82	32,54	35,46	28,02	33,11	34,07
lincRNA-RoR	31,23	31,78	31,83	32,76	31,51	30,87	32,91	33,83	32,87	33,99	34,84	31,44	33,87	29,66
lincRNA-SFMBT2	31,91	36,46	41	34,29	32,5	31,84	41	41	41	41	38,52	36,58	41	31,49
lincRNA-VLDLR	29,13	29,96	31,94	31,21	30,9	29,32	29,94	31,2	31,45	30,84	30,72	30,67	31,83	29,13
LOC285194	35,88	34,91	34,01	34,99	38,05	41	41	36,97	37,22	37,27	41	30,49	36,89	36,59
LUST	26,61	23,58	26,43	29,7	31,27	31	31,78	27,56	29,16	27,54	30,49	21,74	27,67	27,24
Malat1	32,98	31,85	30,5	33,94	39,17	37,3	35,2	32,73	36,5	32,31	38,75	26,45	33,47	35,8
mascRNA	34,15	31,55	33,19	34,89	36,91	37,77	36,53	32,76	37,62	34,69	36,82	28,87	33,85	35,16
MEG3 (family)	37,62	42,62	36,86	41	41	41	41	39,42	41	41	41	32,41	37,64	38,42
MEG9	32,87	29,89	32,71	32,93	36,37	41	41	33,62	37,58	34,77	38,19	28,68	35,26	32,79
MER11C	33,93	32,77	32,28	34,03	38,62	38,93	35,7	33,94	39,17	34,15	36,69	28,12	34	33,53
ncR-uPAR	27,22	25,44	28,23	28,07	31,51	31,82	32,22	26,94	27	29,9	31,54	23,79	29,03	27,19
NDM29	29,94	27,31	29,66	30,41	31,6	32,74	33,85	28,58	32,13	32,56	31,99	27,77	31,26	29,26
NEAT1 (family)	34,17	31,92	31,64	33,32	35,7	37,42	35,7	32,18	33,93	36,42	36,94	27,99	35,18	33,51
Nespas	33,97	32,66	34,07	34,89	38,19	36,68	36,88	33,19	36,08	36,61	37,35	28,65	36,1	41
NRON	34,66	32,65	32,58	33,19	36,16	41	38,08	34,02	34,63	36,82	41	28,54	34,81	33,61
NTT	37,57	34,09	35,46	36,73	38,76	41	41	38,08	41	39,43	41	33,14	38,5	34,99
p53 mRNA	36,02	33,45	34,23	37,74	41	41	41	36,17	37,82	36,61	41	29,22	36,79	34,92

5 Anhang

PCGEM1	36,68	34,32	34,71	36,03	41	41	41	36,14	41	36,74	41	30,28	37,73	34,57
PR antisense transcripts	37,7	41	37,86	38,86	41	41	41	41	41	41	41	33,47	41	37,82
PRINS	36,47	38	35,12	37,41	38,47	41	41	41	41	36,69	41	30,47	37,58	36,12
PSF inhibiting RNA	39,06	39,64	36,91	41	41	41	41	41	41	41	41	33,9	41	41
PTENP1	36,49	37,58	38,08	39,2	41	41	41	38,37	41	38,77	41	32,55	41	37,62
RNCR3	34,3	32,43	32,69	32,9	35,99	38,03	39,52	32,81	33,12	35,96	36,22	28,74	34,21	33,42
SAF	35,61	34,25	35,06	38,24	41	41	41	36,09	36,47	38,01	41	30,99	37,82	36,78
SCA8	34,63	32,45	33,56	34,65	38,68	41	41	34,31	36,11	38,22	38,88	29,13	37,9	34,2
snaR	32,57	31,51	32,78	30,67	32,23	36,11	35,92	30,7	32,97	32,89	33,15	28,72	34	29,99
SNHG1	33,09	31,05	32,95	34,68	38,86	39,03	41	34,24	35,44	38,09	41	27,99	35,77	33,4
SNHG3	30,59	27,19	30,5	29,65	32,15	33,92	34,79	31,7	32,58	31,42	35,44	26,71	31,76	29,26
SNHG4	27,83	23,99	26,66	29,52	30,49	30,42	30,14	27,16	29,21	27,12	30,87	22,5	27,46	28,82
SNHG5	41	41	36	36,02	41	41	41	35,84	41	41	41	41	41	41
SNHG6	34,56	31,26	33,14	34,42	37,23	38,37	36,84	32,87	36,65	34,74	38,17	28,09	35,27	33,78
Sox2ot	39,17	43,93	36,93	37,12	41	41	41	37,8	41	37,73	41	32,19	41	38,06
SRA	35,45	32,92	34,71	35,8	41	41	41	41	41	36,96	41	29,8	36,6	35,21
ST7OT	41	37,44	34,66	35,01	36,11	39,31	37,43	34,96	41	35,53	41	30,19	35,55	34,78
TEA ncRNAs (family)	37,1	34,74	37,23	36,41	41	41	41	35,32	36,79	38,16	39,17	30,45	37,68	35,51
Tmevpg1	34,57	32,27	33,47	37,43	37,48	41	39,38	34,89	37,25	37,05	41	28,87	36,04	33,8
TncRNA	34,2	33,09	31,08	34,1	37,08	38,22	36,48	33,19	34,24	36	41	27,87	35,56	33,9
Tsix	29,27	28,83	31,04	29,24	31,41	32,91	31,72	28,94	31,7	31,95	31,27	24,11	31,51	27,2

TUG1 (family)	38,55	34,27	37,03	36,84	36,49	41	41	37,91	37,18	37,84	39,01	32,6	36,81	35,67
UCA1	39,43	36,2	36,8	39,31	41	41	41	41	41	37,83	41	33,47	41	41
UM9-5	35,63	32,44	33,93	35,97	36,84	38,08	37,05	35,1	36,55	35,53	36,95	29,24	35,84	34,8
WT1-AS	34,9	33,79	34,5	36,38	37,65	41	41	34,58	36,85	36,09	36,9	29,04	36,2	34,86
Xist	34,88	32,72	34,29	36,1	41	41	41	33,69	41	36,43	41	29,13	35,5	34,86
Y RNA-1	28,73	31,59	26,33	25,72	24,63	28,58	31,78	27,07	26,96	25,7	25,7	25,93	25,91	27,75
Zeb2NAT	32,33	29,68	33	33,83	32,52	41	41	34,07	38,09	35,07	37,08	27,71	35,12	30,89
Zfas1	36,75	35,7	34,75	36,08	36,79	41	41	36,2	41	36,38	37,26	29,48	35,62	32,97
Zfx2as	41	22,91	25,7	26,12	28,46	41	41	24,94	25,45	27,41	28,74	20,72	26,31	23,92
18S rRNA	41	21,01	23,15	23,43	22,56	20,01	24,68	22,46	26,51	25,26	27,44	19,72	23,85	21,23
RNU43 (snoRNA)	28,14	25,92	28,95	28,01	30,3	31,29	31,5	27,67	30,79	28,81	31,43	22,88	30,45	27,11
GAPDH	32,63	32,54	33,64	34,09	36,17	37,97	37,85	33,45	36,73	34,83	37,46	28,42	34,53	32,98
LAMIN A/C	38,76	37,27	39,03	41	41	41	41	41	41	41	41	32,53	41	37,4
U6 snRNA	25,96	23,85	25,95	25,72	29,64	29,51	28,62	26,84	29,42	25,47	31,59	22,29	26,32	26,66

Die Tabelle fasst die gemessenen Cq-Werte aller Probanden (K: Kontrollfall; S: Schizophrener Proband) zusammen. Die ncRNAs mit statistisch signifikantem Expressionsunterschied in der vorliegenden Arbeit sind gelb unterlegt. Die ncRNAs, die in der Literatur mit der Erkrankung Schizophrenie assoziiert wurden, sind blau unterlegt.

Tabelle 5.14: Gemessene Cq-Werte in den glialen Zellkernen der Brodmann-Areale 17/18

ncRNA	K3	K5	K6	K7	K8	K9	K4	S2	S7	S8	S3	S6	S4	S1
21A	22,8	22,92	24,3	22,73	23,62	21,69	23,06	26,93	22,44	24,45	20,12	22,54	20,99	23,48
7SK	28,78	28,11	29,91	28,68	28,61	28,51	28,19	30,49	27,56	30,65	25,2	27,14	25,58	29,56
7SL	24,75	41	24,06	22,54	27,11	25,6	28,06	30,69	25,83	27,77	23,83	25,52	25,6	28,02
Air	31,25	32,81	33,31	31,56	37,93	37,13	41	39,1	37,77	41	31,22	37,3	31,86	41
AK023948	33,68	32,17	33,63	31,87	36,84	35,66	35,09	41	38,16	38,55	31,7	36,53	32,45	37,13
Alpha 280	36,56	41	30,67	36,88	34,11	31,77	41	37,02	33,22	41	33,44	31,03	41	38,39
Alpha 250	33,67	31,3	33,88	30,82	36,84	34,17	34,78	36,05	34,51	35,6	30,14	34,68	30,69	36,4
ANRIL	35,66	37,11	41	35,1	41	41	41	41	41	41	33,18	41	36,13	41
anti-NOS2A	37,75	37,18	30,67	34,27	34,65	31,75	37,9	35,07	33,58	35,98	32,72	30,16	36,63	36,94
antiPeg11	37,09	35,78	35,22	35,76	34,62	35,65	34,65	34,86	32,86	34,49	35,45	34,78	35,78	35,55
BACE1AS (family)	33,81	36,59	35,95	34,93	38,66	35,27	36,54	38,53	35,66	37,45	32,02	35,82	33,26	37,44
BC200	25,2	30,42	30,79	29,97	30,69	28,47	29,17	33,62	29,49	30,83	25,31	28,75	27,28	29,67
CAR Intergenic 10	35,89	34,45	37,21	35,89	36,77	36,05	36,64	41	36,62	41	33,05	36,73	32,87	41
DHFR upstream transcripts (family)	38,87	37,69	41	37,34	33,56	35,11	36,61	41	34,55	36,69	30,88	33,45	30,72	36,23
Dio3os (family)	29,95	30,47	31,43	32,68	32,28	32,1	32,16	33,73	31,3	34,2	28,75	31,63	28,65	33,25
DISC2 (family)	34,86	36,12	35,44	34,02	37,27	36,43	36,12	41	37,47	41	32,55	35,54	34,14	41
DLG2AS (family)	36,91	41	31,01	37,34	35,82	41	41	41	35,77	41	36,38	30,63	41	41
E2F4 antisense	38,5	36,79	35,11	34,76	31,92	30,83	34,76	34,06	41	35,54	31,79	29,23	35,68	34,62

EgoA	29,44	25,75	29,89	23,01	30,16	28,75	29,9	32,56	31	33,58	28,11	30,52	28,55	31,59
EGO B	28,92	25,59	30,21	23,5	29,53	27,64	29,9	33,14	30,62	33,4	28,21	29,94	27,92	31,58
Emx2os	30,83	31,85	34,54	30,65	37,26	33,26	34,63	35,21	34,48	35,75	31,43	33,68	30,91	36,06
Evf1 und EVF2	41	41	41	41	41	35,62	41	41	41	41	41	41	41	41
GAS5-family	28,02	28,47	28,99	27,25	32,4	27,63	28,91	30,18	27,98	32,29	26,42	28,14	26,2	30,48
Gomafu	32,88	34,19	35,26	33,99	37,65	35,62	38,24	38,81	35,98	39,35	32,17	35,86	32,92	38,03
H19	32,22	32,88	34,04	31,98	36,45	34,62	35,62	37,46	36,74	37	31,8	41	32,76	36,43
H19 antisense	29,4	26,2	27,69	25,07	32,47	33,92	31,69	33,21	31,45	32,53	27,53	34,43	29,7	32,68
H19 upstream conserved 1 & 2	25,51	23,76	25,44	24,26	28,25	26,99	34,68	31	27,74	29,86	24,8	29,76	25,72	29,58
HAR1A	31,98	30,71	33,2	31,26	31,93	34,55	34,47	36,89	34,96	35,99	30,07	35,52	30,95	37,98
HAR1B	32,51	27,42	30,1	27,09	30,59	32,28	30,8	33,94	31,57	33,53	28,63	31,01	28,91	32,12
HOTAIR	41	41	41	41	32,55	36,96	36,06	35,21	34,27	34,96	32,44	34,2	33,71	36,52
HOTAIRM1	30,82	31,57	32,92	31,45	35,4	34,16	34,24	33,03	33,63	37,02	30,74	33,45	31,23	35,01
HOTTIP	35,77	35,54	36,51	33,85	41	37,69	38,14	41	38,24	41	35,06	36,87	35,08	41
Hoxa11as	29,89	31,65	30,93	28,11	35,19	30,83	32,1	41	31,7	34,26	28,51	31,24	28,6	33,44
HOXA3as	36,6	41	41	36,56	41	41	41	41	41	41	36,14	39,55	37,05	41
HOXA6as	27,25	24,67	28,64	28,14	27,53	25,22	29,51	33,41	27,72	28,25	23,94	25,99	26,65	28,86
HULC	35,08	34,09	35,17	33,43	41	36,86	41	41	36,56	41	34,15	35,57	34,91	41
IGF2AS (family)	32,85	30,05	32,44	30,28	41	36,13	41	39,19	41	41	30,01	41	29,88	41
IPW	33,43	33,71	35,42	32,83	36,83	36,83	36,95	39,17	36,99	37,79	33,04	37,32	34,14	37,85
Jpx	41	41	41	41	37,98	37,47	36,89	37,47	37,31	41	34,21	36,7	33,13	38,92

5 Anhang

Kcnq1ot1	31,03	33,16	32,31	31,42	37,13	36,56	36,58	41	36,6	41	33,13	39,15	33,05	41
KRASPI	32,14	33,49	33,61	31,54	37,09	41	36,13	36,76	37,31	38,17	32,53	36,65	32,7	37,15
L1PA16	35,5	37,1	30,13	32,22	33,05	30,81	35,01	41	33,04	35,85	33,91	30,64	36,13	36,51
lincRNA-p21	31,13	30,85	31,9	29,41	34,03	32,42	33,44	41	32,73	32,74	30,55	32,24	31,65	34,62
lincRNA-RoR	34,23	31,75	29,74	31,27	32,84	31,14	33,17	41	32,15	32,54	31	30,09	30,92	33,28
lincRNA-SFMBT2	34,16	35,84	30,44	32,07	35,04	32,92	37,25	41	35,89	36,2	34,69	31,86	36,56	35,64
lincRNA-VLDLR	31,09	31,28	29,94	30,43	29,32	29,27	28,08	29,73	26,64	29	30,47	29,06	31,27	28,56
LOC285194	32,79	35,45	34,95	33,56	38,63	36,16	37,22	37,82	36,78	41	34,18	35,63	34,24	37,96
LUST	24,16	26,76	27,95	26,48	30,42	24,43	33,7	31,2	28	31,87	24,76	29,11	25,7	26,24
Malat1	29,14	35,18	37,36	34,01	35,02	34,25	34,16	41	34,5	36,66	30,87	41	31,03	34,73
mascRNA	31,61	31,64	32,53	30,12	36,22	35	35,57	41	35,77	37,41	32,58	37,48	32,63	36,92
MEG3 (family)	34,16	34,24	36,79	33,98	41	39,52	41	41	41	41	36,17	41	35,85	41
MEG9	29,73	33,43	31,98	30,15	41	41	41	41	41	41	30,84	41	31,87	41
MER11C	29,77	32,13	34,85	29,94	36,49	34,78	35,97	41	35,28	36,57	32,58	34,62	31,46	36,03
ncR-uPAR	25,26	25,54	27,73	27,1	29,62	27,01	29,55	41	28,54	31,77	26,29	29,13	26,15	29,48
NDM29	41	41	41	41	30,02	29,71	32,92	41	32,26	35,02	27,1	32,13	28,13	31,83
NEAT1 (family)	31,08	28,75	33,7	30,21	34,63	33,4	35,15	41	33,99	36,17	31,47	32,44	31,06	35,66
Nespas	31,25	31,59	32,24	30,12	41	34,66	35,64	36,64	34,82	36,71	31,54	34,05	32,64	36,58
NRON	29,98	30,79	31,63	29,74	37,29	34,77	35,99	41	35,23	37,15	31,72	34,16	32,28	36,99
NTT	32,81	33	33,18	33,69	37,18	39,56	37,42	41	36,86	38,27	33,51	36,13	34,11	37,39
p53 mRNA	33,87	33,77	33,46	31,76	41	37,17	41	41	37,33	41	33,22	36,52	33,18	41

PCGEM1	33,48	37,32	35,11	33,69	37,11	36,79	37,01	41	37,61	38,26	33,02	41	34,53	38,46
PR antisense transcripts	37,22	37,31	37,02	34,16	41	41	41	41	41	41	36,98	41	38,9	41
PRINS	33,53	35,08	39,44	33,57	41	37,31	39,31	41	37,42	41	34,09	37,78	33,96	41
PSF inhibiting RNA	36,89	38,25	41	37,31	41	41	41	41	41	41	37,71	41	36,99	41
PTENP1	33,95	37,62	36,9	33,92	41	41	41	41	41	41	35,14	41	34,43	41
RNCR3	30,65	31,92	33,12	31,86	37,23	33,92	36,13	41	34,95	36,38	31,8	34,11	31,96	35,97
SAF	34,14	35,87	37,19	33,92	41	37,34	38,44	41	37,11	41	35,6	36,64	35,13	41
SCA8	31,99	32,63	34,66	32,11	38,47	35,47	36,71	41	35,9	38,24	32,17	34,66	32,16	38,05
snaR	30,96	29,25	29,98	30,27	41	32,47	34,64	35,94	33,63	33,86	28,66	34,44	30,45	34,55
SNHG1	32,02	34,13	33,59	31,2	38,34	35,04	36,41	41	35,16	37,71	32,49	34,65	31,52	37,6
SNHG3	28,54	29,66	29,53	29,65	32,49	29,7	32,8	33,31	31,14	30,92	26,02	31,56	27,73	32,17
SNHG4	24,65	27,27	28,65	26,66	31,18	28,26	29,59	29,86	27,66	30,68	25,2	27,79	25,65	29,88
SNHG5	38,03	41	37,47	41	41	36	41	41	41	41	41	41	41	41
SNHG6	32,03	31,54	33,02	30,71	35,22	34,61	35,57	36,5	35,29	37,16	31,66	38,8	32,23	36,55
Sox2ot	35,51	35,89	37,27	36,51	38,69	39,2	41	41	38,76	41	35,26	36,89	36,5	41
SRA	33,72	36,47	35,09	31,98	37,41	37,75	37,36	41	38,16	41	33,16	38,69	33,5	41
ST7OT	32,68	32,31	33,96	31,64	36,13	34,97	35,76	41	35,9	36,67	32,94	34,8	33,57	37,3
TEA ncRNAs (family)	34,77	34,4	36,03	34,06	38,35	36,88	36,95	41	38,19	41	33,94	36,58	33,83	41
Tmevpg1	35,82	34,03	35,61	33,06	37,02	35,5	37,07	36,97	36,21	37,97	32,2	35,63	32,81	37,44
TncRNA	30,6	30,71	35,25	33,71	36,05	33,63	35,8	41	35,46	36,76	31,78	34,04	31,67	36,68
Tsix	28,28	26,76	28,75	27,03	30,88	27,82	32,02	32,93	30,09	32,48	25,3	27,73	26,88	31,73

5 Anhang

TUG1 (family)	35,71	36,46	37,47	36,47	41	37,63	39,13	41	37,87	39,1	34,08	37,31	34,11	41
UCA1	35,78	37,92	37,31	35,46	41	41	41	41	41	41	35,03	37,87	36,59	41
UM9-5	32,67	32,27	35,78	31,01	36,43	35,23	36,39	36,8	35,61	36,85	32,67	34,46	34,94	37,35
WT1-AS	33,55	35,28	37,88	34,04	36,37	36,55	38,11	38,79	37,48	38,75	32,01	41	33,1	38,5
Xist	32,43	41	34,89	32,68	38,37	36,71	36,75	41	39,05	41	32,72	41	34,04	37,76
Y RNA-1	26,58	23,95	22,86	21,83	26,64	26,24	27,62	41	26,17	28,08	23,98	26,57	24,16	27,74
Zeb2NAT	31,67	30,66	30,84	30,51	37,01	35,77	36,67	37,78	37,16	41	30,04	39,54	31,43	41
Zfas1	34,11	31,65	32,97	30,16	37,37	36,23	36,92	41	37,71	41	31,46	35,66	33,12	41
Zfhx2as	23,65	41	26,29	24,85	38,14	37,09	41	41	41	41	22,51	37,42	23,73	41
18S rRNA	41	20,3	21,89	17,87	23,78	21,92	24,77	32,28	23,55	28,07	20,43	23,54	22,26	25,79
RNU43 (snoRNA)	27,49	25,42	27,61	25,69	29,99	26,92	29,78	41	29,57	31,16	24,55	29,49	25,51	30,48
GAPDH	31,96	33,42	34,63	32,59	35,9	33,02	35,61	36,89	36,22	38,91	30,99	35,44	31,29	37,18
LAMIN A/C	36,67	41	41	37	41	41	41	41	41	41	35,59	41	36,94	41
U6 snRNA	23,66	24,17	27,05	26,32	27,2	25,53	28,26	29,51	26,89	30,08	22,74	26,57	24,64	27,11

Die Tabelle fasst die gemessenen Cq-Werte aller Probanden (K: Kontrollfall; S: Schizophrener Proband) zusammen. Die ncRNAs mit statistisch signifikantem Expressionsunterschied in der vorliegenden Arbeit sind gelb unterlegt. Die ncRNAs, die in der Literatur mit der Erkrankung Schizophrenie assoziiert wurden, sind blau unterlegt.

5.6 Expressionsanalyse von 90 ncRNAs: Ergebnisse

Tabelle 5.15: Ergebnis der Expressionsanalyse in den neuronalen Zellkernen des Brodmann-Areals 10

ncRNA	Kontrollgruppe		Schizophrene Probanden		Statistik	
	MW	SD	MW	SD	FC	p-Wert
21A	127,319	112,385	154,095	77,018	1,21	0,366
7SK	3,885	2,938	5,414	4,128	1,39	0,534
7SL	36,761	57,132	6,563	4,213	-5,60	0,138
Air	0,053	0,024	0,158	0,179	3,00	0,052
AK023948	0,034	0,036	0,036	0,016	1,08	0,180
Alpha 280	0,065	0,138	0,004	0,005	-15,93	0,234
Alpha 250	0,028	0,035	0,046	0,065	1,66	0,836
ANRIL	0,008	0,007	0,009	0,009	1,13	0,836
anti-NOS2A	0,117	0,217	0,025	0,035	-4,66	0,234
antiPeg11	0,055	0,060	0,087	0,110	1,56	0,628
BACE1AS*	0,036	0,023	0,045	0,023	1,25	0,534
BC200	8,665	5,322	37,489	55,718	4,33	0,052
CAR Intergenic 10	0,015	0,010	0,020	0,015	1,36	0,628
DHFR upstream transcripts*	0,074	0,038	0,060	0,046	-1,22	0,294
Dio3os*	0,426	0,317	0,300	0,052	-1,42	0,836
DISC2*	0,018	0,009	0,031	0,043	1,73	0,836
DLG2AS*	0,011	0,010	0,009	0,018	-1,20	0,294
E2F4 antisense	0,195	0,364	0,042	0,067	-4,62	0,234
EgoA	0,469	0,533	0,313	0,284	-1,50	0,946
EGO B	0,507	0,628	0,416	0,414	-1,22	0,946
Emx2os	0,061	0,034	0,105	0,053	1,72	0,138
Evf1 und EVF2	0,002	0,004	0,002	0,004	1,06	0,730
GAS5-family	5,741	5,451	10,688	8,671	1,86	0,234

5 Anhang

Gomafu	0,037	0,021	0,072	0,078	1,94	0,836
H19	0,029	0,026	0,042	0,030	1,41	0,628
H19 antisense	0,888	1,274	0,900	0,871	1,01	0,946
H19 upstream conserved 1 & 2	8,588	12,948	3,664	2,113	-2,34	0,946
HAR1A	0,047	0,029	0,049	0,043	1,03	0,836
HAR1B	0,653	0,754	0,669	0,368	1,02	0,534
HOTAIR	0,077	0,067	0,115	0,101	1,48	0,628
HOTAIRM1	0,178	0,069	0,312	0,228	1,75	0,294
HOTTIP	0,077	0,174	0,008	0,003	-9,47	0,730
Hoxa11as	0,474	0,334	0,415	0,354	-1,14	0,730
HOXA3as	0,002	0,002	0,005	0,005	2,13	0,294
HOXA6as	2,968	1,466	3,079	3,037	1,04	0,730
HULC	0,019	0,014	0,045	0,042	2,39	0,294
IGF2AS*	0,197	0,168	0,277	0,341	1,41	0,836
IPW	0,033	0,028	0,052	0,048	1,57	0,366
Jpx	0,008	0,005	0,021	0,011	2,56	0,022
Kcnq1ot1	0,011	0,011	0,071	0,120	6,32	0,138
KRAS P1	0,019	0,008	0,055	0,043	2,90	0,052
L1PA16	0,047	0,059	0,043	0,063	-1,11	0,628
lincRNA-p21	0,191	0,137	0,268	0,165	1,40	0,534
lincRNA-RoR	0,221	0,353	0,126	0,137	-1,76	1,000
lincRNA- SFMBT2	0,038	0,051	0,017	0,019	-2,21	1,000
lincRNA- VLDLR	0,641	0,573	1,132	1,882	1,77	0,730
LOC285194	0,021	0,008	0,025	0,018	1,19	0,628
LUST	7,025	3,968	14,007	12,88	1,99	0,366
Malat1	0,061	0,047	0,080	0,072	1,30	0,836
masrRNA	0,039	0,031	0,114	0,118	2,88	0,294
MEG3*	0,004	0,003	0,007	0,005	1,98	0,138
MEG9	0,529	0,307	0,709	0,475	1,34	0,730
MER11C	0,089	0,046	0,148	0,111	1,66	0,628

ncR-uPAR	3,809	2,250	10,801	7,545	2,84	0,074
NDM29	1,152	1,333	0,532	0,268	-2,17	0,946
NEAT1*	0,060	0,043	0,062	0,024	1,03	0,446
Nespas	0,030	0,019	0,031	0,017	1,05	0,836
NRON	0,073	0,044	0,085	0,079	1,16	1,000
NTT	0,016	0,006	0,015	0,012	-1,07	0,446
p53 mRNA	0,014	0,011	0,043	0,031	2,98	0,034
PCGEM1	0,019	0,014	0,019	0,009	1,03	0,628
PR antisense transcripts	0,003	0,003	0,003	0,003	1,11	0,946
PRINS	0,004	0,004	0,01	0,009	2,32	0,294
PSF inhibiting RNA	0,001	0,001	0,006	0,010	6,54	0,366
PTENP1	0,003	0,003	0,005	0,005	1,68	0,446
RNCR3	0,074	0,043	0,157	0,133	2,13	0,234
SAF	0,012	0,008	0,019	0,023	1,62	1,000
SCA8	0,018	0,009	0,020	0,009	1,11	0,946
snaR	0,124	0,111	0,120	0,034	-1,03	0,534
SNHG1	0,045	0,019	0,079	0,078	1,78	1,000
SNHG3	1,448	1,058	0,806	0,185	-1,80	0,446
SNHG4	6,226	2,931	14,847	14,969	2,38	0,180
SNHG5	0,002	0,005	0,003	0,003	1,46	0,294
SNHG6	0,045	0,038	0,115	0,112	2,57	0,074
Sox2ot	0,003	0,002	0,007	0,005	2,55	0,138
SRA	0,018	0,014	0,027	0,019	1,50	0,534
ST7OT	0,043	0,070	0,050	0,019	1,15	0,034
TEA ncRNAs*	0,011	0,005	0,025	0,017	2,39	0,234
Tmevpg1	0,038	0,025	0,055	0,027	1,45	0,234
TncRNA	0,038	0,013	0,042	0,016	1,12	0,628
Tsix	0,942	0,938	1,189	1,756	1,26	1,000
TUG1*	0,015	0,008	0,013	0,014	-1,16	0,534
UCA1	0,003	0,002	0,008	0,009	2,44	0,730
UM9-5	0,037	0,022	0,069	0,057	1,86	0,366

5 Anhang

WT1-AS	0,009	0,006	0,017	0,011	1,85	0,366
Xist	0,022	0,013	0,060	0,058	2,74	0,138
Y RNA-1	18,394	30,308	14,828	13,634	-1,24	0,294
Zeb2NAT	0,217	0,422	0,181	0,238	-1,20	0,366
Zfas1	0,029	0,036	0,049	0,043	1,69	0,102
Zfhx2as	28,296	16,065	51,443	39,431	1,82	0,366

∗: family

Die Tabelle fasst die errechneten Mittelwerte der relativen Genexpression (MW), mit Standardabweichung (SD; STABW.N Funktion in Excel) sowie die Ergebnisse der statistischen Berechnung (Fold Change (FC) und p-Wert nach U-Test von Mann-Whitney) zusammen. Die ncRNAs mit statistisch signifikantem Expressionsunterschied in der vorliegenden Arbeit sind gelb unterlegt. Die ncRNAs, die in der Literatur mit der Erkrankung Schizophrenie assoziiert wurden, sind blau unterlegt.

Tabelle 5.16: Ergebnis der Expressionsanalyse in den neuronalen Zellkernen der Brodmann-Areale 17/18

ncRNA	Kontrollgruppe		Schizophrene Probanden		Statistik	
	MW	SD	MW	SD	FC	p-Wert
21A	153,745	132,006	164,204	92,666	1,07	0,818
7SK	2,624	1,223	6,733	9,760	2,57	1,000
7SL	43,399	45,563	13,557	7,800	-3,20	0,588
Air	0,106	0,158	0,042	0,031	-2,53	0,938
AK023948	0,057	0,049	0,026	0,013	-2,21	0,240
Alpha 280	1,619	2,387	0,008	0,011	-200,77	0,818
Alpha 250	0,122	0,132	0,132	0,106	1,08	0,240
ANRIL	0,003	0,002	0,004	0,006	1,69	0,700
anti-NOS2A	3,750	6,121	0,023	0,034	-160,65	0,394
antiPeg11	0,091	0,115	0,052	0,065	-1,75	0,700
BACE1AS*	0,030	0,037	0,015	0,011	-1,98	0,818
BC200	6,596	4,884	5,197	2,264	-1,27	0,938
CAR Intergenic 10	0,003	0,002	0,014	0,016	5,14	0,132
DHFR upstream transcripts*	0,024	0,037	0,069	0,074	2,81	0,394
Dio3os*	0,595	0,762	0,433	0,342	-1,37	0,818
DISC2*	0,025	0,026	0,019	0,019	-1,28	0,938
DLG2AS*	3,989	7,343	0,004	0,003	-984,39	0,700
E2F4 antisense	0,207	0,344	0,039	0,045	-5,35	0,394
EgoA	1,329	1,071	1,232	0,991	-1,08	> 0,938
EGO B	1,034	0,805	0,592	0,258	-1,75	0,588
Emx2os	0,178	0,200	0,073	0,049	-2,42	0,700
Evf1 und EVF2	0,102	0,226	0,001	0,001	-129,99	0,818
GAS5-family	4,697	5,875	2,015	0,692	-2,33	0,938
Gomafu	0,056	0,054	0,042	0,021	-1,33	0,938
H19	0,049	0,076	0,042	0,033	-1,17	0,484

5 Anhang

H19 antisense	3,773	5,141	0,572	0,27	-6,60	0,938
H19 upstream	22,38	30,211	6,158	3,75	-3,63	0,938
conserved 1 & 2						
HAR1A	0,116	0,103	0,066	0,033	-1,76	1,000
HAR1B	2,181	2,567	0,813	0,472	-2,68	0,938
HOTAIR	0,009	0,014	0,063	0,078	7,42	0,240
HOTAIRM1	0,232	0,192	0,153	0,086	-1,52	0,818
HOTTIP	0,018	0,022	0,004	0,002	-4,02	0,310
Hoxa11as	2,147	3,839	0,188	0,116	-11,45	0,310
HOXA3as	0,003	0,002	0,001	0,001	-2,71	0,094
HOXA6as	4,429	7,751	8,765	7,837	1,98	0,094
HULC	0,028	0,042	0,013	0,011	-2,16	0,938
IGF2AS*	0,336	0,431	0,096	0,080	-3,52	0,938
IPW	0,029	0,030	0,051	0,052	1,74	0,394
Jpx	0,004	0,005	0,006	0,008	1,69	0,588
Kcnq1ot1	0,150	0,250	0,026	0,014	-5,78	0,240
KRAS P1	0,075	0,095	0,043	0,026	-1,75	0,938
L1PA16	9,200	16,518	0,031	0,034	-298,83	0,240
lincRNA-p21	0,285	0,265	0,154	0,093	-1,85	0,818
lincRNA-RoR	5,910	10,048	0,231	0,213	-25,6	0,818
lincRNA-SFMBT2	1,744	2,623	0,051	0,076	-34,33	0,394
lincRNA-VLDLR	4,823	6,766	2,319	3,010	-2,08	0,818
LOC285194	0,058	0,050	0,019	0,013	-2,97	0,042
LUST	14,338	14,505	5,343	2,621	-2,68	0,310
Malat1	0,061	0,063	0,314	0,366	5,19	0,042
masRNA	0,149	0,19	0,062	0,033	-2,39	0,818
MEG3*	0,020	0,035	0,010	0,011	-2,08	0,700
MEG9	1,216	0,646	0,807	0,963	-1,51	0,310
MER11C	0,259	0,228	0,165	0,062	-1,57	1,000
ncR-uPAR	16,923	19,219	3,804	3,305	-4,45	0,132
NDM29	0,008	0,013	0,184	0,189	23,76	0,132

NEAT1*	0,185	0,101	0,145	0,099	-1,27	0,310
Nespas	0,139	0,097	0,069	0,038	-2,01	0,180
NRON	0,277	0,365	0,080	0,066	-3,45	0,394
NTT	0,084	0,109	0,023	0,026	-3,64	0,310
p53 mRNA	0,090	0,121	0,027	0,018	-3,29	0,310
PCGEM1	0,019	0,018	0,032	0,017	1,65	0,240
PR antisense transcripts	0,056	0,115	0,002	0,001	-25,34	0,938
PRINS	0,008	0,007	0,015	0,008	1,81	0,240
PSF inhibiting RNA	0,003	0,002	0,001	0,001	-2,47	0,180
PTENP1	0,011	0,014	0,006	0,003	-1,88	0,938
RNCR3	0,314	0,372	0,042	0,018	-7,54	0,026
SAF	0,047	0,060	0,017	0,005	-2,69	0,484
SCA8	0,051	0,044	0,043	0,030	-1,17	0,700
snaR	0,339	0,318	0,114	0,071	-2,98	0,310
SNHG1	0,121	0,142	0,045	0,013	-2,66	0,240
SNHG3	1,679	1,128	1,104	1,205	-1,52	0,132
SNHG4	6,045	3,794	4,485	1,138	-1,35	0,588
SNHG5	0,002	0,002	0,002	0,002	-1,33	0,700
SNHG6	0,097	0,086	0,065	0,036	-1,49	0,818
Sox2ot	0,004	0,002	0,007	0,007	1,75	0,818
SRA	0,053	0,082	0,033	0,025	-1,61	0,588
ST7OT	0,087	0,105	0,049	0,042	-1,75	1,000
TEA ncRNAs*	0,056	0,078	0,012	0,010	-4,61	0,042
Tmevpg1	0,047	0,049	0,036	0,014	-1,29	0,700
TncRNA	0,044	0,020	0,033	0,017	-1,34	0,484
Tsix	1,949	2,132	0,488	0,181	-3,99	0,484
TUG1*	0,060	0,095	0,017	0,011	-3,43	0,818
UCA1	0,007	0,007	0,004	0,002	-1,92	0,818
UM9-5	0,063	0,068	0,022	0,010	-2,85	0,484
WT1-AS	0,006	0,005	0,013	0,007	2,19	0,094
Xist	0,067	0,094	0,048	0,041	-1,40	0,818

5 Anhang

Y RNA-1	66,686	104,436	5,352	4,232	-12,46	0,310
Zeb2NAT	0,722	0,984	0,054	0,023	-13,38	0,394
Zfas1	0,150	0,206	0,022	0,010	-6,80	0,818
Zfhx2as	50,046	80,12	15,377	12,122	-3,25	0,700

*: family

Die Tabelle fasst die errechneten Mittelwerte der relativen Genexpression (MW), mit Standardabweichung (SD; STABW.N Funktion in Excel) sowie die Ergebnisse der statistischen Berechnung (Fold Change (FC) und p-Wert nach U-Test von Mann-Whitney) zusammen. Die ncRNAs mit statistisch signifikantem Expressionsunterschied in der vorliegenden Arbeit sind gelb unterlegt. Die ncRNAs, die in der Literatur mit der Erkrankung Schizophrenie assoziiert wurden, sind blau unterlegt.

Tabelle 5.17: Ergebnis der Expressionsanalyse in den glialen Zellkernen des Brodmann-Areals 10

ncRNA	Kontrollgruppe		Schizophrene Probanden		Statistik	
	MW	SD	MW	SD*	FC	p-Wert
21A	121,192	136,755	72,775	64,909	-1,67	0,428
7SK	2,472	1,113	3,024	2,135	1,22	> 0,930
7SL	15,846	12,566	3,876	2,980	-4,09	0,082
Air	0,046	0,031	0,052	0,018	1,12	0,330
AK023948	0,031	0,021	0,019	0,008	-1,68	0,662
Alpha 280	0,120	0,207	0,08	0,159	-1,50	0,246
Alpha 250	0,027	0,037	0,054	0,070	2,04	0,536
ANRIL	0,019	0,023	0,031	0,064	1,59	0,536
anti-NOS2A	0,256	0,423	0,233	0,477	-1,10	0,330
antiPeg11	0,118	0,205	0,053	0,052	-2,21	0,930
BACE1AS*	0,047	0,037	0,034	0,029	-1,37	0,428
BC200	7,569	7,895	3,809	2,924	-1,99	0,331
CAR Intergenic 10	0,009	0,009	0,013	0,008	1,41	0,536
DHFR upstream transcripts*	0,046	0,061	0,047	0,033	1,01	0,330
Dio3os*	0,401	0,374	0,228	0,135	-1,76	0,331
DISC2*	0,016	0,008	0,013	0,013	-1,18	0,536
DLG2AS*	0,025	0,030	0,144	0,241	5,79	0,930
E2F4 antisense	0,500	0,795	0,336	0,748	-1,49	0,052
EgoA	0,408	0,328	0,304	0,248	-1,34	0,536
EGO B	0,433	0,275	0,334	0,229	-1,30	0,331
Emx2os	0,043	0,019	0,099	0,067	2,29	0,178
Evf1 und EVF2	0,004	0,005	0,003	0,006	-1,14	0,792
GAS5-family	4,940	4,342	5,428	3,772	1,10	0,930
Gomafu	0,026	0,02	0,023	0,008	-1,10	0,930
H19	0,042	0,042	0,034	0,012	-1,22	0,930
H19 antisense	0,846	0,724	0,712	0,359	-1,19	0,930

5 Anhang

H19 upstream con- served 1 & 2	5,757	3,656	2,479	1,513	-2,32	0,126
HAR1A	0,071	0,043	0,028	0,010	-2,58	0,126
HAR1B	0,485	0,195	0,186	0,114	-2,6	0,018
HOTAIR	0,140	0,185	0,125	0,221	-1,12	0,536
HOTAIRM1	0,163	0,142	0,273	0,350	1,67	0,792
HOTTIP	0,005	0,005	0,006	0,004	1,20	0,536
Hoxa11as	0,372	0,185	0,467	0,370	1,26	1,000
HOXA3as	0,004	0,005	0,002	0,002	-1,87	0,792
HOXA6as	4,981	4,498	0,951	0,481	-5,24	0,126
HULC	0,016	0,020	0,041	0,064	2,59	0,330
IGF2AS*	0,217	0,199	0,227	0,068	1,05	0,246
IPW	0,013	0,007	0,015	0,008	1,14	0,536
Jpx	0,015	0,012	0,010	0,007	-1,50	0,331
Kcnq1ot1	0,024	0,012	0,018	0,008	-1,35	0,536
KRAS P1	0,023	0,014	0,013	0,007	-1,69	0,428
L1PA16	0,085	0,096	0,068	0,122	-1,25	0,331
lincRNA-p21	0,149	0,166	0,274	0,250	1,84	0,536
lincRNA-RoR	0,396	0,526	0,246	0,280	-1,61	0,536
lincRNA-SFMBT2	0,177	0,278	0,029	0,062	-6,16	0,246
lincRNA-VLDLR	0,736	0,774	0,634	0,587	-1,16	0,792
LOC285194	0,018	0,014	0,013	0,010	-1,46	0,330
LUST	6,066	5,008	5,611	2,079	-1,08	0,930
Malat1	0,132	0,187	0,118	0,082	-1,11	0,428
masRNA	0,043	0,022	0,051	0,032	1,17	0,930
MEG3*	0,002	0,002	0,003	0,002	1,24	0,536
MEG9	0,097	0,047	0,044	0,015	-2,18	0,052
MER11C	0,050	0,049	0,051	0,026	1,01	0,428
ncR-uPAR	2,679	0,867	8,911	13,864	3,33	0,331
NDM29	0,859	0,347	0,734	0,551	-1,17	0,792
NEAT1*	0,088	0,073	0,107	0,106	1,22	1,000
Nespas	0,027	0,010	0,038	0,029	1,42	0,930
NRON	0,058	0,036	0,066	0,063	1,14	0,930

NTT	0,009	0,005	0,005	0,005	-1,94	0,126
p53 mRNA	0,013	0,013	0,018	0,011	1,34	0,246
PCGEM1	0,010	0,009	0,011	0,006	1,03	0,930
PR antisense transcripts	0,002	0,001	0,001	0,001	-1,32	0,792
PRINS	0,008	0,007	0,007	0,005	-1,23	0,930
PSF inhibiting RNA	0,002	0,002	0,001	0,001	-2,02	0,930
PTENP1	0,002	0,002	0,002	0,001	-1,08	0,930
RNCR3	0,062	0,032	0,141	0,194	2,26	0,930
SAF	0,009	0,007	0,015	0,019	1,71	0,331
SCA8	0,029	0,017	0,030	0,023	1,03	0,930
snaR	0,299	0,310	0,290	0,221	-1,03	0,792
SNHG1	0,052	0,032	0,052	0,039	-1,01	1,000
SNHG3	0,740	0,307	0,456	0,259	-1,62	0,178
SNHG4	4,802	3,729	5,344	2,514	1,11	0,331
SNHG5	0,005	0,005	0,002	0,004	-1,87	0,792
SNHG6	0,045	0,025	0,053	0,023	1,17	0,246
Sox2ot	0,003	0,002	0,003	0,001	1,05	0,930
SRA	0,015	0,009	0,010	0,009	-1,42	0,331
ST7OT	0,022	0,022	0,018	0,008	-1,22	0,930
TEA ncRNAs*	0,005	0,002	0,016	0,014	3,42	0,082
Tmevpg1	0,029	0,020	0,027	0,013	-1,07	1,000
TncRNA	0,090	0,124	0,084	0,085	-1,07	0,792
Tsix	0,815	0,444	1,357	0,987	1,67	0,536
TUG1*	0,013	0,016	0,011	0,011	-1,22	1,000
UCA1	0,002	0,002	0,002	0,001	-1,6	0,536
UM9-5	0,027	0,015	0,028	0,013	1,05	0,792
WT1-AS	0,017	0,008	0,027	0,013	1,53	0,330
Xist	0,018	0,012	0,025	0,017	1,38	0,428
Y RNA-1	38,338	65,823	14,549	14,23	-2,64	0,792
Zeb2NAT	0,230	0,249	0,081	0,084	-2,86	0,178
Zfas1	0,016	0,013	0,023	0,020	1,46	0,331

5 Anhang

Zfhx2as	11,587	7,471	34,256	37,623	2,96	0,246
---------	--------	-------	--------	--------	------	-------

*: family

Die Tabelle fasst die errechneten Mittelwerte der relativen Genexpression (MW), mit Standardabweichung (SD; STABW.N Funktion in Excel) sowie die Ergebnisse der statistischen Berechnung (Fold Change (FC) und p-Wert nach U-Test von Mann-Whitney) zusammen. Die ncRNAs mit statistisch signifikantem Expressionsunterschied in der vorliegenden Arbeit sind gelb unterlegt. Die ncRNAs, die in der Literatur mit der Erkrankung Schizophrenie assoziiert wurden, sind blau unterlegt.

Tabelle 5.18: Ergebnis der Expressionsanalyse in den glialen Zellkernen der Brodmann-Areale 17/18

ncRNA	Kontrollgruppe		Schizophrene Probanden		Statistik	
	MW	SD	MW	SD	FC	p-Wert
21A	101,735	89,327	201,993	115,086	1,99	0,148
7SK	2,474	2,810	5,850	3,600	2,36	0,074
7SL	20,269	20,069	16,919	13,079	-1,2	0,876
Air	0,044	0,040	0,017	0,014	-2,57	0,756
AK023948	0,043	0,027	0,018	0,007	-2,41	0,268
Alpha 280	0,109	0,180	0,181	0,266	1,67	0,638
Alpha 250	0,063	0,049	0,064	0,018	1,02	0,638
ANRIL	0,002	0,003	0,002	0,002	1,05	0,756
anti-NOS2A	0,107	0,178	0,291	0,490	2,73	0,530
antiPeg11	0,031	0,037	0,075	0,094	2,44	0,876
BACE1AS*	0,011	0,007	0,022	0,008	1,95	0,030
BC200	1,859	2,000	2,485	1,053	1,34	0,432
CAR Intergenic 10	0,010	0,007	0,012	0,007	1,21	0,638
DHFR upstream transcripts*	0,030	0,059	0,074	0,034	2,45	0,048
Dio3os*	0,248	0,164	0,408	0,198	1,64	0,202
DISC2*	0,014	0,010	0,012	0,010	-1,13	0,756
DLG2AS*	0,066	0,146	0,190	0,362	2,88	0,530
E2F4 antisense	0,123	0,182	0,511	0,951	4,16	0,202
EgoA	6,665	12,23	0,708	0,326	-9,41	0,756
EGO B	5,501	8,450	0,901	0,444	-6,10	0,876
Emx2os	0,076	0,054	0,067	0,03	-1,13	0,202
Evf1 und EVF2	0,001	0,002	0,001	0,001	-2,26	0,638
GAS5-family	1,738	1,434	3,510	2,470	2,02	0,148
Gomafu	0,015	0,007	0,020	0,006	1,33	0,202
H19	0,040	0,018	0,019	0,011	-2,16	0,074
H19 antisense	2,451	2,946	0,351	0,218	-6,98	0,756

5 Anhang

H19 upstream con- served 1 & 2	9,252	6,962	3,947	2,589	-2,34	0,202
HAR1A	0,149	0,162	0,048	0,022	-3,13	0,106
HAR1B	0,991	0,702	0,497	0,221	-1,99	0,268
HOTAIR	0,055	0,12	0,046	0,035	-1,21	0,148
HOTAIRM1	0,084	0,037	0,094	0,041	1,12	0,756
HOTTIP	0,007	0,006	0,005	0,004	-1,33	0,876
Hoxa11as	0,370	0,330	0,400	0,162	1,08	0,530
HOXA3as	0,001	0,001	0,001	0,000	1,10	0,756
HOXA6as	5,259	3,961	8,860	7,400	1,68	0,530
HULC	0,010	0,010	0,012	0,011	1,14	0,756
IGF2AS*	0,089	0,095	0,044	0,059	-2,02	0,268
IPW	0,019	0,010	0,010	0,003	-1,83	0,048
Jpx	0,004	0,007	0,010	0,005	2,34	0,106
Kcnq1ot1	0,063	0,059	0,009	0,007	-6,67	0,048
KRASPI	0,040	0,032	0,016	0,004	-2,51	0,202
L1PA16	0,195	0,253	0,235	0,347	1,21	0,876
lincRNA-p21	0,181	0,117	0,158	0,111	-1,14	0,756
lincRNA-RoR	0,273	0,317	0,433	0,470	1,59	0,530
lincRNA-SFMBT2	0,119	0,208	0,097	0,148	-1,23	0,530
lincRNA-VLDLR	1,989	2,965	6,012	7,171	3,02	1,000
LOC285194	0,016	0,010	0,014	0,009	-1,16	0,876
LUST	5,533	5,719	11,216	14,902	2,03	0,638
Malat1	0,087	0,122	0,060	0,039	-1,45	0,876
mascRNA	0,090	0,082	0,020	0,009	-4,48	0,048
MEG3*	0,007	0,006	0,001	0,001	-5,63	0,202
MEG9	0,106	0,117	0,016	0,018	-6,76	0,530
MER11C	0,098	0,110	0,043	0,016	-2,30	0,756
ncR-uPAR	3,525	1,072	2,976	1,542	-1,18	0,432
NDM29	0,393	0,682	0,512	0,181	1,30	0,106
NEAT1*	0,152	0,146	0,105	0,083	-1,44	0,756
Nespas	0,094	0,088	0,046	0,025	-2,06	0,530
NRON	0,143	0,124	0,040	0,022	-3,56	0,432

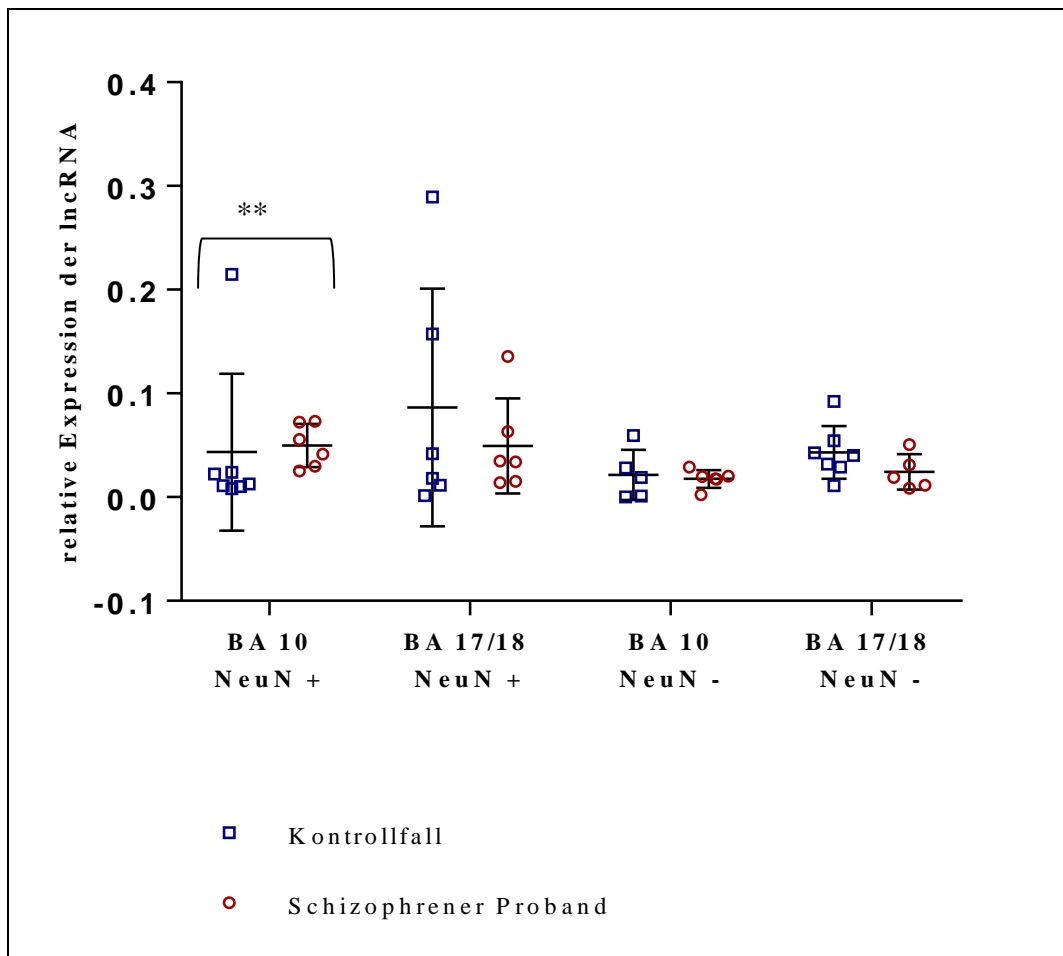
NTT	0,028	0,028	0,014	0,006	-2,08	0,344
p53 mRNA	0,028	0,034	0,010	0,005	-2,74	1,000
PCGEM1	0,015	0,008	0,007	0,003	-2,22	0,148
PR antisense transcripts	0,004	0,005	0,001	0,000	-5,06	0,202
PRINS	0,008	0,009	0,006	0,003	-1,26	0,638
PSF inhibiting RNA	0,001	0,001	0,001	0,000	-1,10	0,876
PTENP1	0,006	0,007	0,002	0,002	-2,67	0,638
RNCR3	0,061	0,039	0,049	0,021	-1,25	0,876
SAF	0,007	0,006	0,007	0,006	-1,03	1,000
SCA8	0,031	0,020	0,029	0,016	-1,09	0,876
snaR	0,242	0,273	0,123	0,037	-1,97	1,000
SNHG1	0,043	0,040	0,037	0,019	-1,17	0,756
SNHG3	0,498	0,290	0,742	0,193	1,49	0,074
SNHG4	2,836	2,366	4,780	2,798	1,69	0,202
SNHG5	0,002	0,002	0,001	0,001	-3,03	0,268
SNHG6	0,074	0,048	0,027	0,015	-2,77	0,030
Sox2ot	0,003	0,002	0,004	0,004	1,27	1,000
SRA	0,020	0,023	0,006	0,004	-3,29	0,202
ST7OT	0,043	0,024	0,024	0,015	-1,78	0,202
TEA ncRNAs*	0,011	0,005	0,007	0,005	-1,46	0,432
Tmevpg1	0,015	0,009	0,021	0,005	1,36	0,202
TncRNA	0,057	0,045	0,044	0,023	-1,3	1,000
Tsix	1,442	0,616	2,482	2,193	1,72	0,756
TUG1*	0,003	0,001	0,006	0,003	2,01	0,148
UCA1	0,003	0,002	0,002	0,002	-1,12	0,756
UM9-5	0,042	0,042	0,027	0,022	-1,54	0,638
WT1-AS	0,011	0,008	0,010	0,006	-1,1	0,756
Xist	0,020	0,016	0,007	0,005	-2,78	0,432
Y RNA-1	36,513	42,468	13,666	7,560	-2,67	0,876
Zeb2NAT	0,130	0,155	0,027	0,026	-4,91	0,148
Zfas1	0,068	0,085	0,016	0,010	-4,34	0,432

5 Anhang

Zfhx2as	5,417	6,520	4,535	5,565	-1,19	1,000
---------	-------	-------	-------	-------	-------	-------

*: family

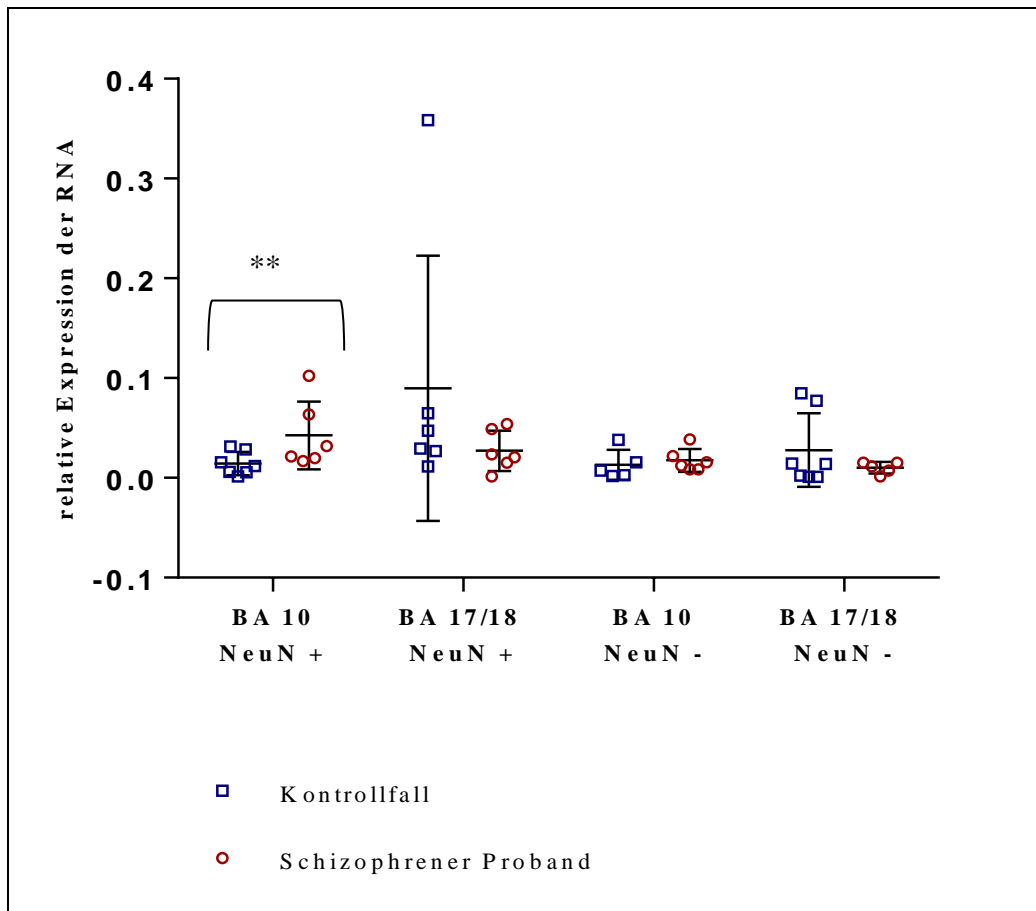
Die Tabelle fasst die errechneten Mittelwerte der relativen Genexpression (MW), mit Standardabweichung (SD; STABW.N Funktion in Excel) sowie die Ergebnisse der statistischen Berechnung (Fold Change (FC) und p-Wert nach U-Test von Mann-Whitney) zusammen. Die ncRNAs mit statistisch signifikantem Expressionsunterschied in der vorliegenden Arbeit sind gelb unterlegt. Die ncRNAs, die in der Literatur mit der Erkrankung Schizophrenie assoziiert wurden, sind blau unterlegt.

Abbildung 5.1: ST7OT: Einzelwertdiagramm der relativen Genexpression

Darstellung der relativen Expression von ST7OT (Y-Achse) in den untersuchten Hirnregionen und Zelltypen (X-Achse). Abgebildet sind die individuellen Datenpunkte der Probanden (blaue Vierecke: Kontrollfälle; rote Kreise: Schizophrene Probanden), die Mittelwerte (horizontale Linien) und Standardabweichungen (vertikale Linien).

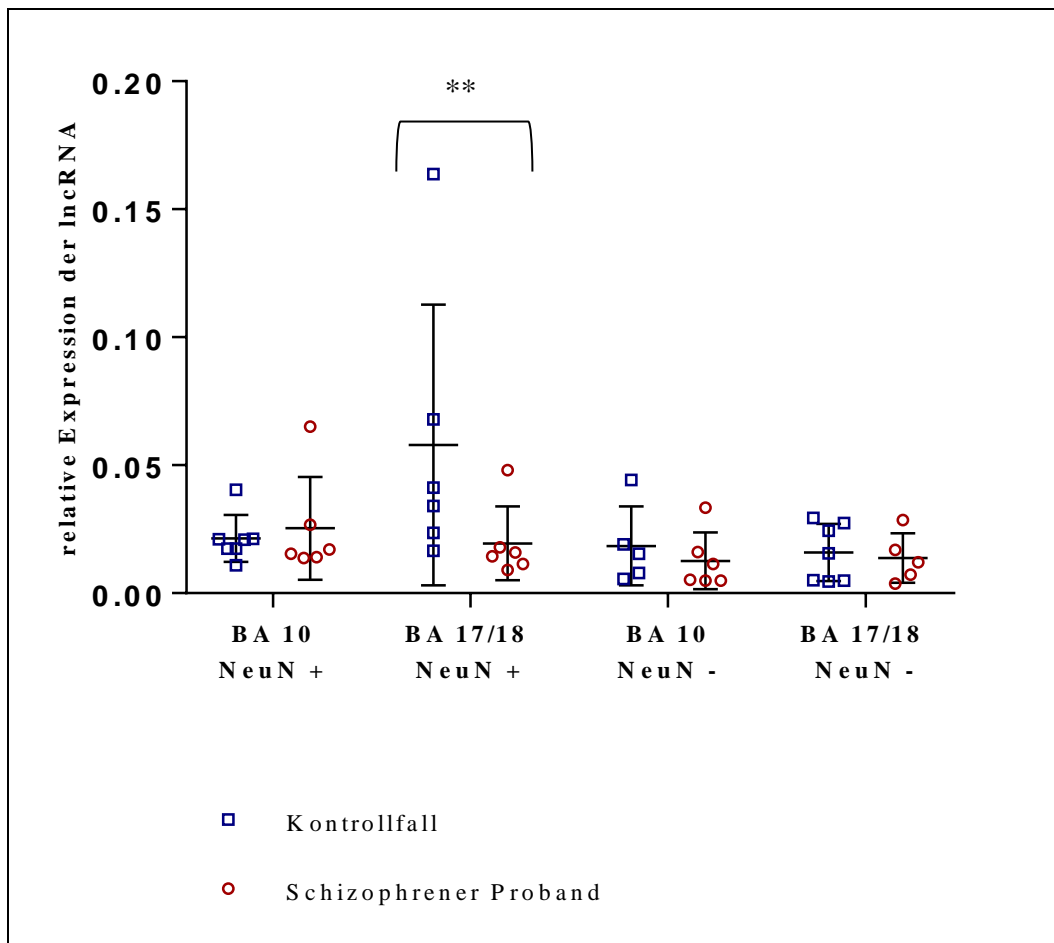
*Die individuellen Datenpunkte der schizophrenen Probanden liegen in den neuronalen Zellkernen des Brodmann-Areals 10 im Bereich einer höheren relativen Genexpression verglichen mit der Kontrollgruppe (**).*

Abbildung 5.2: p53 mRNA: Einzelwertdiagramm der relativen Genexpression



Darstellung der relativen Expression von p53mRNA (Y-Achse) in den untersuchten Hirnregionen und Zelltypen (X-Achse). Abgebildet sind die individuellen Datenpunkte der Probanden (blaue Vierecke: Kontrollfälle; rote Kreise: Schizophrene Probanden), die Mittelwerte (horizontale Linien) und Standardabweichungen (vertikale Linien).

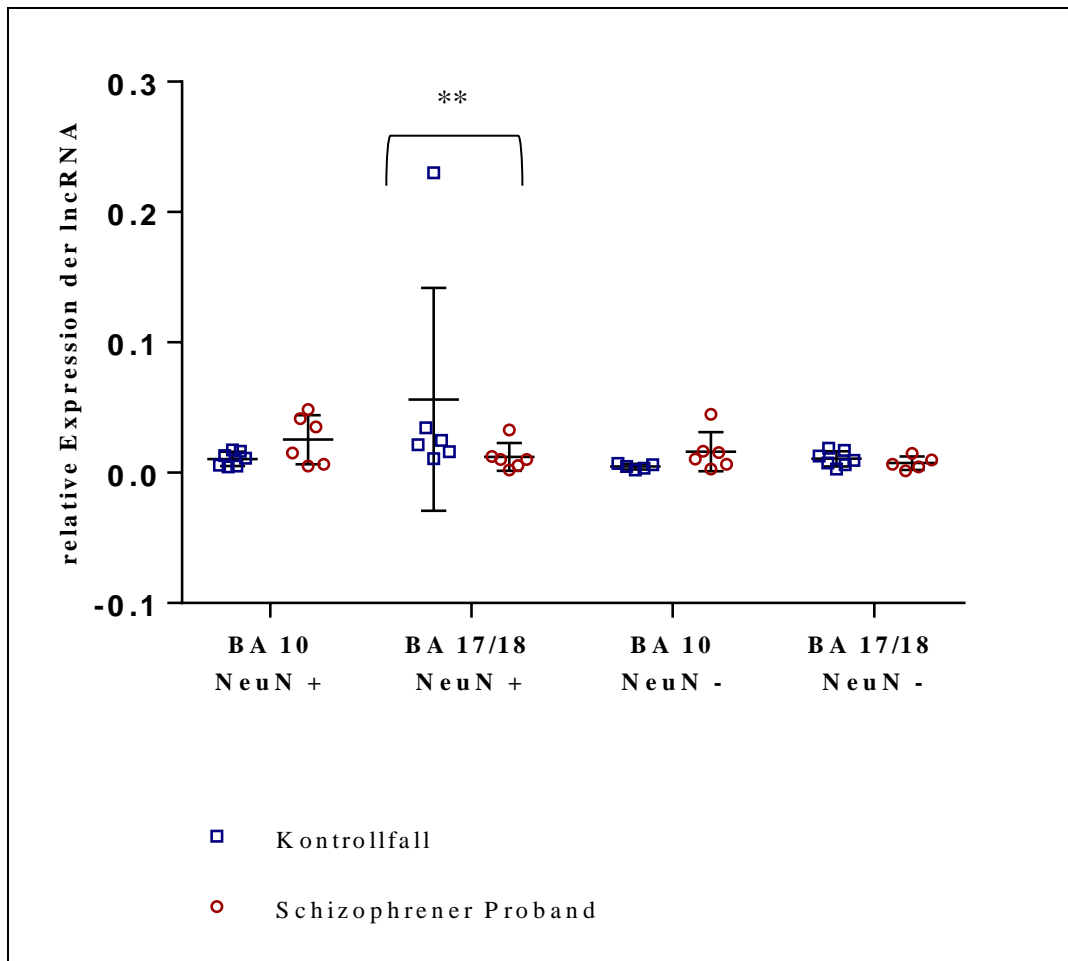
*Die individuellen Datenpunkte der schizophrenen Probanden liegen in den neuronalen Zellkernen des Brodmann-Areals 10 im Bereich einer höheren relativen Genexpression verglichen mit der Kontrollgruppe (**).*

Abbildung 5.3: LOC285194: Einzelwertdiagramm der relativen Genexpression

Darstellung der relativen Expression von LOC285194 (Y-Achse) in den untersuchten Hirnregionen und Zelltypen (X-Achse). Abgebildet sind die individuellen Datenpunkte der Probanden (blaue Vierecke: Kontrollfälle; rote Kreise: Schizophrene Probanden), die Mittelwerte (horizontale Linien) und Standardabweichungen (vertikale Linien).

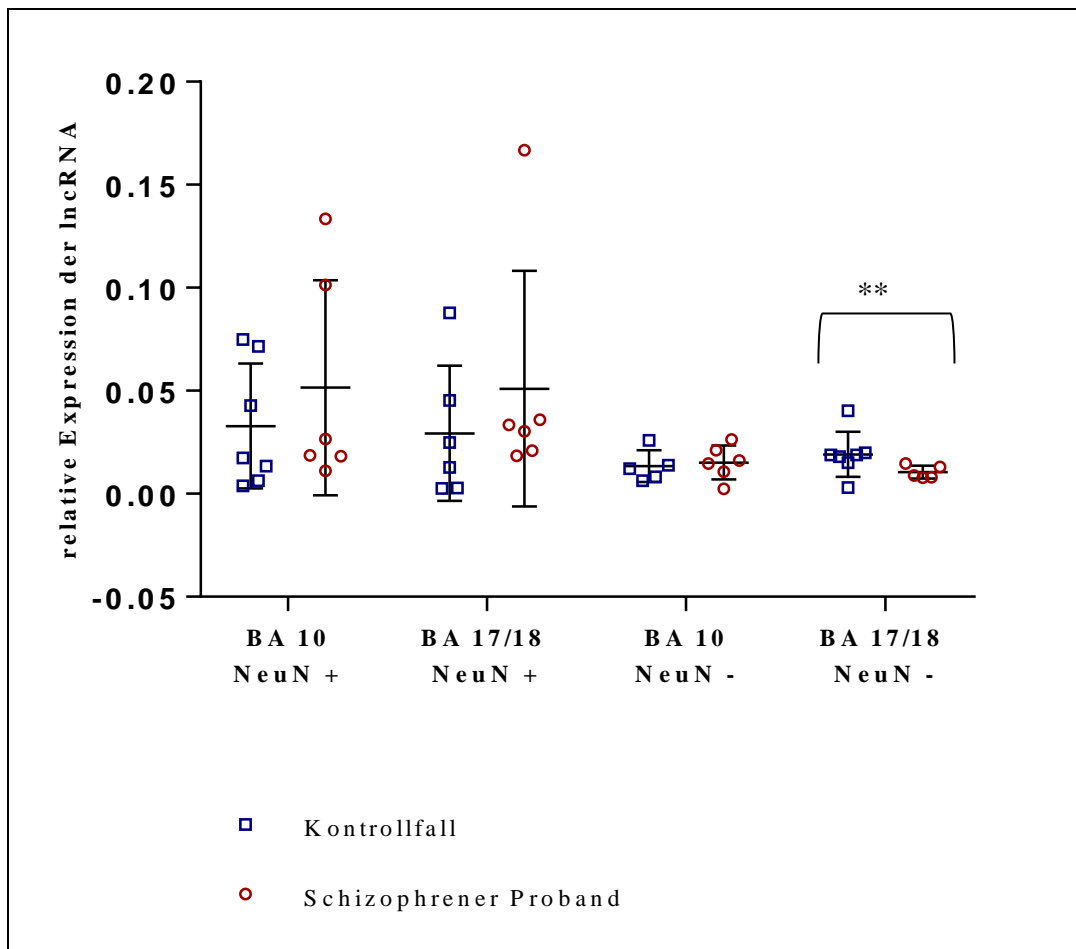
*Die individuellen Datenpunkte der schizophrenen Probanden liegen in den neuronalen Zellkernen der Brodmann-Areale 17/18 durchschnittlich im Bereich einer geringeren relativen Genexpression als die Werte der Kontrollgruppe (**).*

Abbildung 5.4: TEA ncRNAs (family): Einzelwertdiagramm der relativen Genexpression



Darstellung der relativen Expression von TEA ncRNAs (family) (Y-Achse) in den untersuchten Hirnregionen und Zelltypen (X-Achse). Abgebildet sind die individuellen Datenpunkte der Probanden (blaue Vierecke: Kontrollfälle; rote Kreise: Schizophrene Probanden), die Mittelwerte (horizontale Linien) und Standardabweichungen (vertikale Linien).

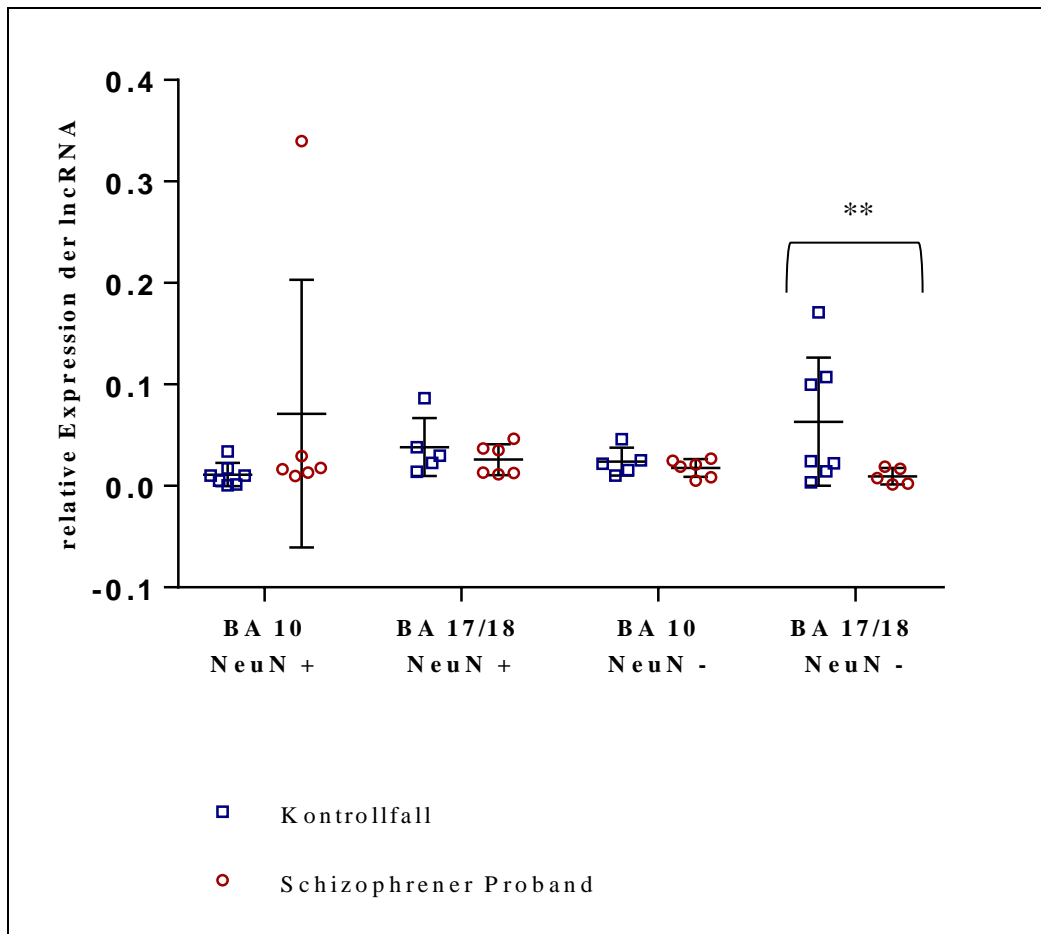
In den neuronalen Zellkernen der Brodmann-Areale 17/18 liegen die individualisierten Datenpunkte der schizophrenen Probanden im Bereich einer niedrigeren relativen Expression als die Werte der Kontrollgruppe (**).

Abbildung 5.5: IPW: Einzelwertdiagramm der relativen Genexpression

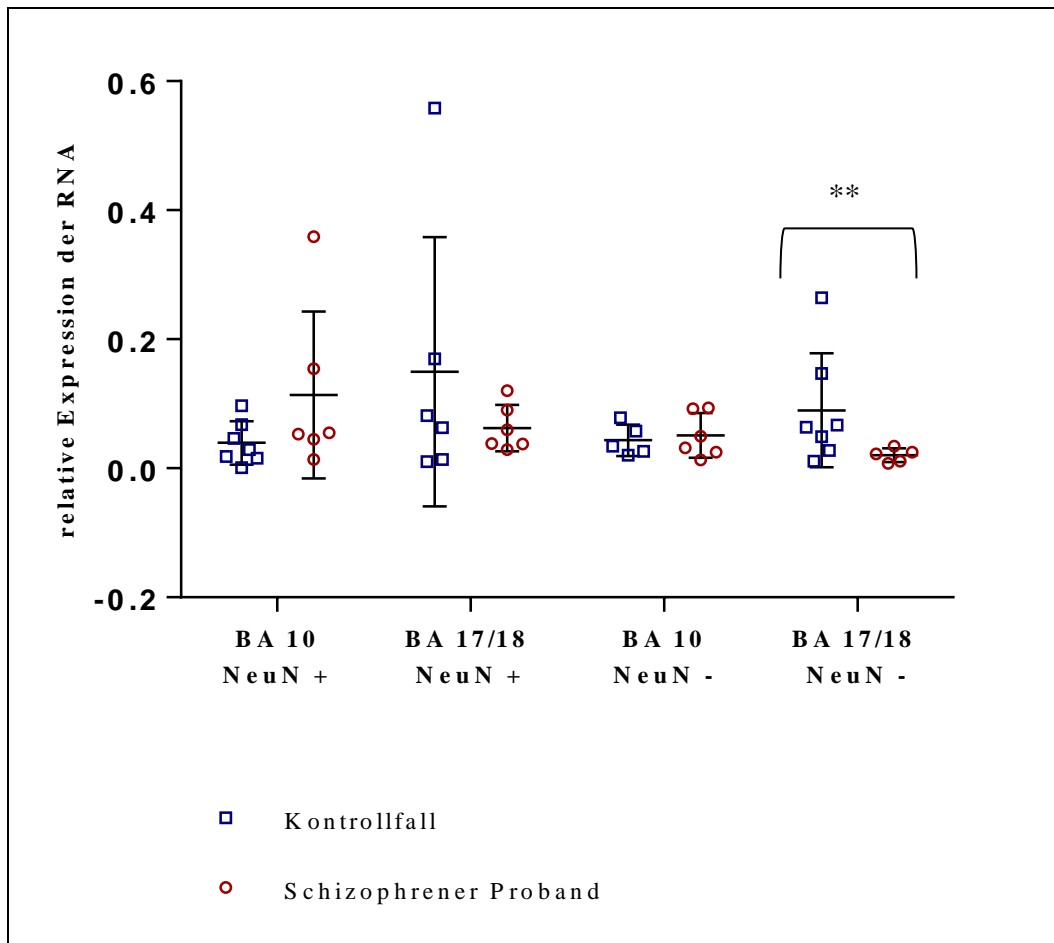
Darstellung der relativen Expression von IPW (Y-Achse) in den untersuchten Hirnregionen und Zelltypen (X-Achse). Abgebildet sind die individuellen Datenpunkte der Probanden (blaue Vierecke: Kontrollfälle; rote Kreise: Schizophrene Probanden), die Mittelwerte (horizontale Linien) und Standardabweichungen (vertikale Linien).

*Dem Diagramm ist in den glialen Zellkernen der Brodmann-Areale 17/18 eine niedrigere relative Expression in der Gruppe der schizophrenen Probanden verglichen mit der Kontrollgruppe zu entnehmen (**).*

Abbildung 5.6: *Kcnq1ot1*: Einzelwertdiagramm der relativen Genexpression*



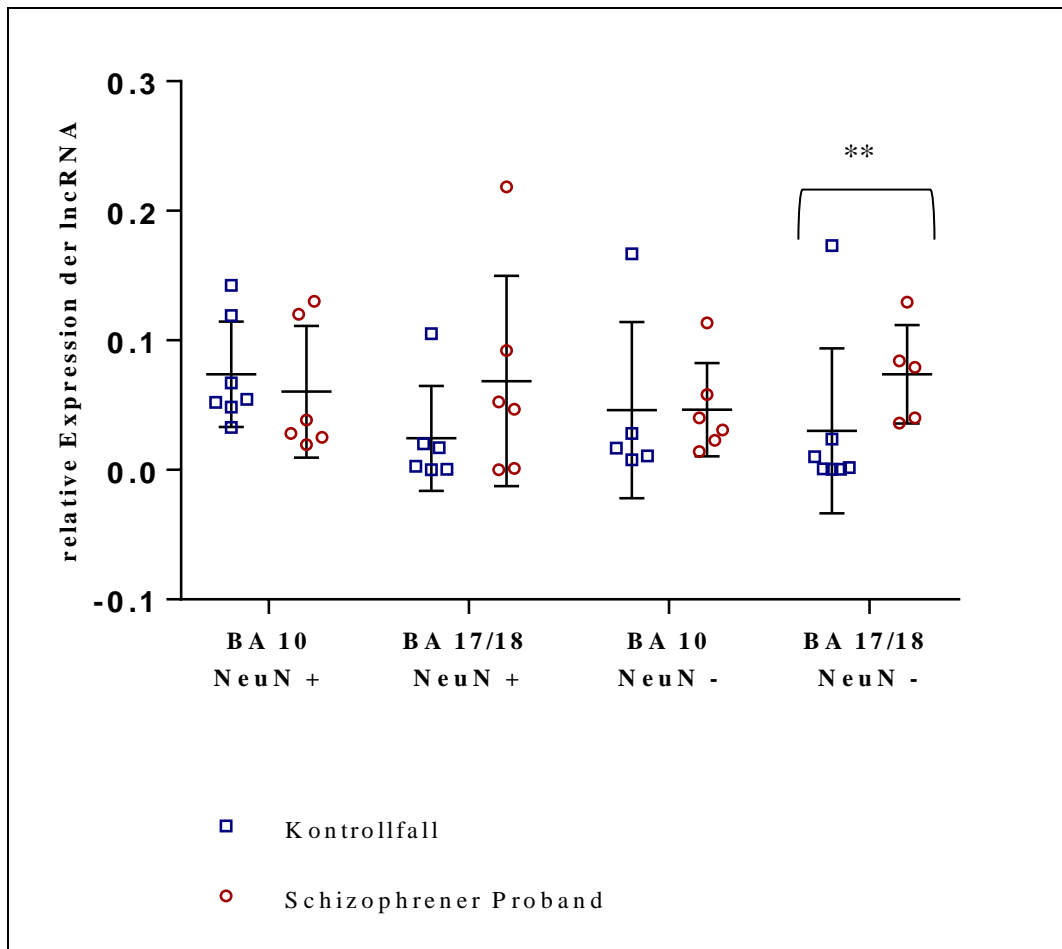
Darstellung der relativen Expression von *Kcnq1ot1* (Y-Achse) in den untersuchten Hirnregionen und Zelltypen (X-Achse). Abgebildet sind die individuellen Datenpunkte der Probanden (blaue Vierecke: Kontrollfälle; rote Kreise: Schizophrene Probanden), die Mittelwerte (horizontale Linien) und Standardabweichungen (vertikale Linien). In den glialen Zellkernen der Brodmann-Areale 17/18 liegen die individuellen Datenpunkte der schizophrenen Probanden im Bereich einer niedrigeren relativen Genexpression als die Werte der Kontrollgruppe (**). *Im dargestellten Diagramm fehlt ein stark abweichende Werte (K5 in den neuronalen Zellkernen der Brodmann-Areale 17/18), da die starke Deviation die Skala der Y-Achse beeinflusst und das Diagramm keine Aussage über die anderen Messwerte zulassen würde.

Abbildung 5.7: MascRNA: Einzelwertdiagramm der relativen Genexpression

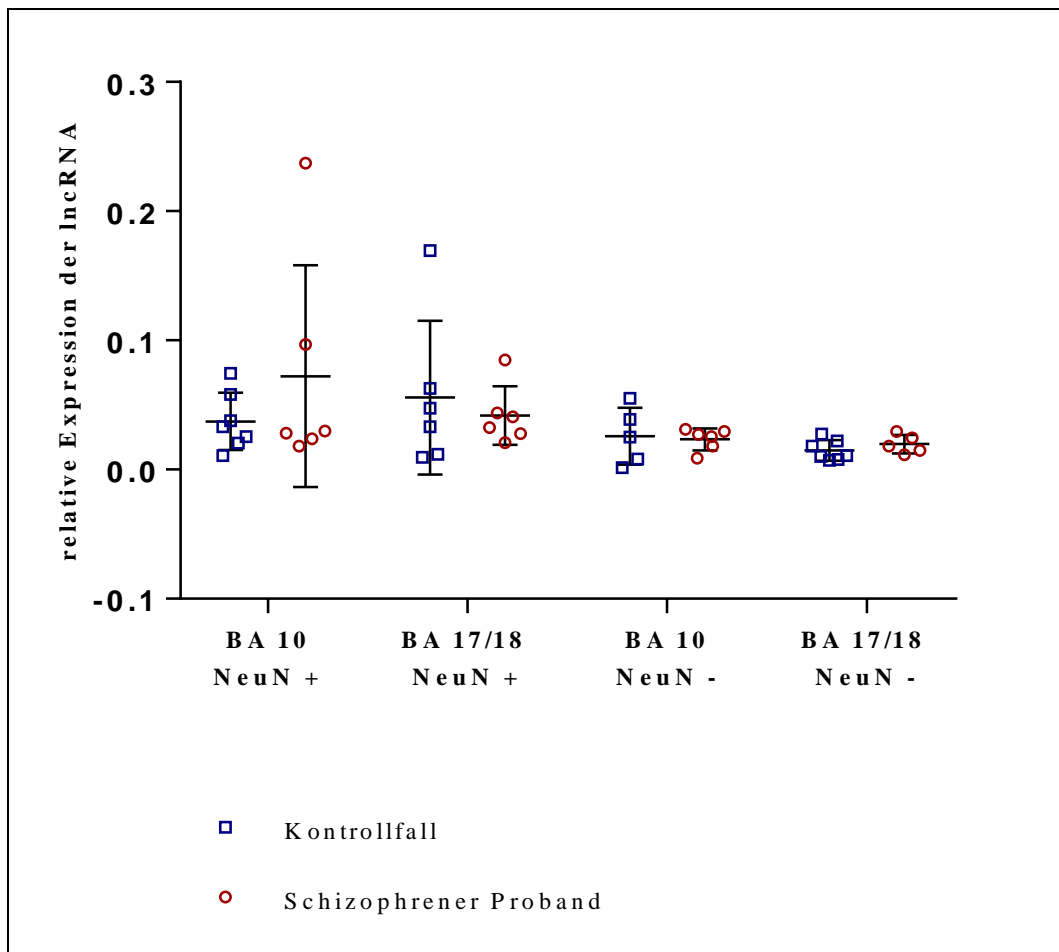
Darstellung der relativen Expression von *mascRNA* (Y-Achse) in den untersuchten Hirnregionen und Zelltypen (X-Achse). Abgebildet sind die individuellen Datenpunkte der Probanden (blaue Vierecke: Kontrollfälle; rote Kreise: Schizophrene Probanden), die Mittelwerte (horizontale Linien) und Standardabweichungen (vertikale Linien).

In den glialen Zellkernen der Brodmann-Areale 17/18 liegen die individuellen Datenpunkte der schizophrenen Probanden auf einem niedrigeren Niveau der relativen Genexpression als die Werte der Kontrollgruppe (**).

Abbildung 5.8: DHFR upstream transcripts (family): Einzelwertdiagramm der relativen Genexpression



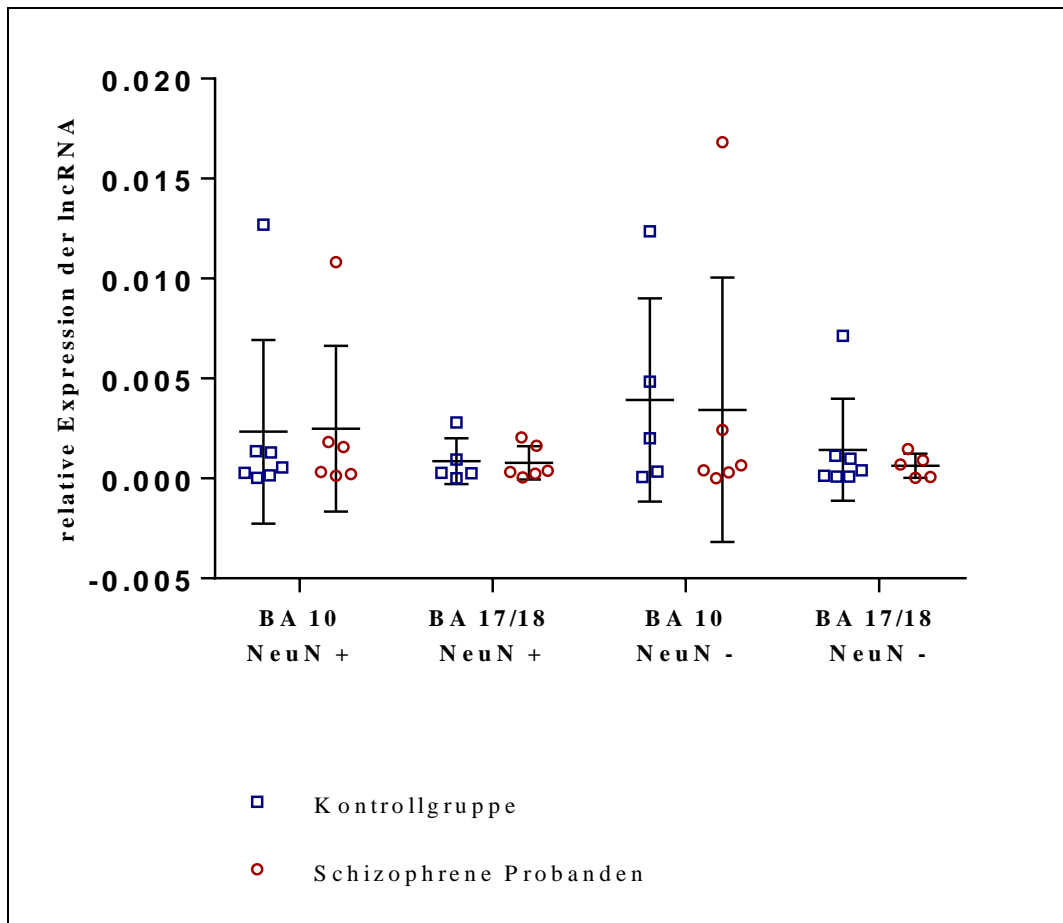
Darstellung der relativen Expression von DHFR upstream transcripts (family) (Y-Achse) in den untersuchten Hirnregionen und Zelltypen (X-Achse). Abgebildet sind die individuellen Datenpunkte der Probanden (blaue Vierecke: Kontrollfälle; rote Kreise: Schizophrene Probanden), die Mittelwerte (horizontale Linien) und Standardabweichungen (vertikale Linien). Im Diagramm ist deutlich zu erkennen, dass die Mehrzahl der individuellen Datenpunkte der schizophrenen Probanden in den glialen Zellkernen der Brodmann-Areale 17/18 einer höheren relativen Genexpression zuordenbar ist als die Werte der Kontrollgruppe (**). Eine ähnliche, nicht statistisch signifikante Tendenz lässt sich auch in den glialen Zellkernen des Brodmann-Areals 10 erkennen.

Abbildung 5.9: Gomafu: Einzelwertdiagramm der relativen Genexpression

Darstellung der relativen Expression von Gomafu (Y-Achse) in den untersuchten Hirnregionen und Zelltypen (X-Achse). Abgebildet sind die Daten der einzelnen Probanden (blaue Vierecke: Kontrollfälle; rote Kreise: Schizophrene Probanden), die Mittelwerte (horizontalen Linien) und Standardabweichungen (vertikale Linien).

Die Abbildung zeigt eine vergleichbare relativen Genexpression der lncRNA Gomafu zwischen der Kontrollgruppe und der Gruppe der schizophrenen Probanden in den untersuchten Hirnregionen und Zelltypen.

Abbildung 5.10: Evf1 und Evf2: Einzelwertdiagramm der relativen Genexpression



Darstellung der relativen Expression von Evf1 und Evf2 (Y-Achse) in den untersuchten Hirnregionen und Zelltypen (X-Achse). Abgebildet sind die individuellen Datenpunkte der Probanden (blaue Vierecke: Kontrollfälle; rote Kreise: Schizophrene Probanden), die Mittelwerte (horizontalen Linien) und Standardabweichungen (vertikale Linien).

Im dargestellten Streudiagramm fehlt ein stark abweichende Werte (K5 in den neuronalen Zellkernen der Brodmann-Areale 17/18), da die starke Deviation die Skala der Y-Achse beeinflusst und das Diagramm keine Aussage über die anderen Messwerte zulassen würde.

Die gemeinsame Expression der lncRNAs Evf1 und Evf2 verhält sich zwischen der Kontrollgruppe und den schizophrenen Probanden vergleichbar.

5.7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Zusammenspiel zwischen einem Neuron und den Gliazellen	6
Abbildung 1.2: Topologie der Brodmann-Areale [52].....	9
Abbildung 1.3: DNA-Methylierung [90].....	16
Abbildung 2.1: Graphen der Durchflusszytometrie	33
Abbildung 2.2: Prinzip der Bisulfitkonvertierung [130]	39
Abbildung 2.3: PCR-Kontrolle: Fotodokumentation	41
Abbildung 2.4: Sequenz des untersuchten FKBP5-Genabschnitts	45
Abbildung 2.5: Auswertungskriterien	46
Abbildung 3.1: Verteilung der normalisierten Zellkerne	53
Abbildung 3.2: Auszug aus einem Sequenz-Chromatogramm.....	58
Abbildung 3.3: Vier Phasen einer RT-PCR.....	61
Abbildung 3.4: Cq-Wert Bestimmung nach der SDM-Methode	63
Abbildung 3.5: Normalisierte Cq-Werte in Abhängigkeit von den RIN-Werten..	67
Abbildung 3.6: Einzelwertdiagramm der relativen Expression von Jpx	79
Abbildung 3.7: Einzelwertdiagramm der relativen Expression von RNCR3	82
Abbildung 3.8: Einzelwertdiagramm der relativen Expression von Malat1	83
Abbildung 3.9: Einzelwertdiagramm der relativen Expression von Har1A.....	85

5 Anhang

Abbildung 3.10: Einzelwertdiagramm der relativen Expression von Har1B*	86
Abbildung 3.11: Einzelwertdiagramm der relativen Expression von SNHG6	89
Abbildung 3.12: Einzelwertdiagramm der relativen Expression von BACE1AS (family)	90
Abbildung 3.13: Einzelwertdiagramm der relativen Expression von DISC-2	92
Abbildung 5.1: ST7OT: Einzelwertdiagramm der relativen Genexpression.....	172
Abbildung 5.2: p53 mRNA: Einzelwertdiagramm der relativen Genexpression	173
Abbildung 5.3: LOC285194: Einzelwertdiagramm der relativen Genexpression	174
Abbildung 5.4: TEA ncRNAs (family): Einzelwertdiagramm der relativen Genexpression	175
Abbildung 5.5: IPW: Einzelwertdiagramm der relativen Genexpression	176
Abbildung 5.6: Kcnq1ot1: Einzelwertdiagramm der relativen Genexpression* .	177
Abbildung 5.7: MascRNA: Einzelwertdiagramm der relativen Genexpression..	178
Abbildung 5.8: DHFR upstream transcripts (family): Einzelwertdiagramm der relativen Genexpression.....	179
Abbildung 5.9: Gomafu: Einzelwertdiagramm der relativen Genexpression.....	180
Abbildung 5.10: Evf1 und Evf2: Einzelwertdiagramm der relativen Genexpression	181

5.8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1: Risikofaktoren für Schizophrenie	11
Tabelle 2.1: Charakteristika der Probanden.....	26
Tabelle 2.2: Krankheitsverlauf der schizophrenen Probanden	27
Tabelle 2.3: Durchschnittswerte in den untersuchten Regionen.....	29
Tabelle 2.4: PCR-Primer	39
Tabelle 2.5: PCR-Zyklen	40
Tabelle 2.6: Zyklen der Sequenzierungsreaktion.....	43
Tabelle 2.7: Einstellungen des Light Cyclers	48
Tabelle 2.8: Vordesignte, vorvalidierte Primer.....	49
Tabelle 3.1: Anzahl der neuronalen und glialen Zellkerne	51
Tabelle 3.2: Auswertung der Sequenz-Chromatogramme	57
Tabelle 3.3: Stabilitätswerte der potentiellen Referenzgene nach Normfinder je Hirnregion und Zelltyp	70
Tabelle 3.4: NcRNAs mit statistisch signifikantem Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und den schizophrenen Probanden.....	77
Tabelle 4.1: Studienüberblick- Anzahl der Neuronen und Gliazellen im präfrontalen oder occipitalen Kortex bei Schizophrenie	97
Tabelle 5.1: Materialien.....	117

5 Anhang

Tabelle 5.2: Verwendete Geräte.....	120
Tabelle 5.3: Ermittelte Zellkernanzahl, eingesetzte Gewebemenge und normalisierte Zellkernmenge.....	121
Tabelle 5.4: Ermittelte Zellkernanzahl und extrahierte und normalisierte DNA- Menge	123
Tabelle 5.5: Ermittelte Zellkernanzahl und extrahierte und normalisierte RNA- Menge	125
Tabelle 5.6: RNA-Menge** und RIN- Werte	127
Tabelle 5.7: Methylierung des FKBP5-Gens (Intron 7; 2. GRE) in den neuronalen Zellkernen des Brodmann-Areals 10	128
Tabelle 5.8: Methylierung des FKBP5-Gens (Intron 7; 2. GRE) in den neuronalen Zellkernen der Brodmann-Areale 17/18	130
Tabelle 5.9: Methylierung des FKBP5-Gens (Intron 7; 2. GRE) in den glialen Zellkernen des Brodmann-Areals 10	132
Tabelle 5.10: Methylierung des FKBP5-Gens (Intron 7; 2. GRE) in den glialen Zellkernen der Brodmann-Areale 17/18	134
Tabelle 5.11: Gemessene Cq-Werte in den neuronalen Zellkernen des Brodmann- Areals 10	136
Tabelle 5.12: Gemessene Cq-Werte in den neuronalen Zellkernen der Brodmann- Areale 17/18	141
Tabelle 5.13: Gemessene Cq-Werte in den glialen Zellkernen des Brodmann- Areals 10	146

Tabelle 5.14: Gemessene Cq-Werte in den glialen Zellkernen der Brodmann-Areale 17/18	151
Tabelle 5.15: Ergebnis der Expressionsanalyse in den neuronalen Zellkernen des Brodmann-Areals 10.....	156
Tabelle 5.16: Ergebnis der Expressionsanalyse in den neuronalen Zellkernen der Brodmann-Areale 17/18.....	160
Tabelle 5.17: Ergebnis der Expressionsanalyse in den glialen Zellkernen des Brodmann-Areals 10.....	164
Tabelle 5.18: Ergebnis der Expressionsanalyse in den glialen Zellkernen der Brodmann-Areale 17/18.....	168

5.9 Endnoten

1. Schmitt, A., Malchow, B., Keeser, D., Falkai, P. und Hasan, A. (2015). *Neurobiologie der Schizophrenie*. Der Nervenarzt, 86 (3), SS. 324-331, DOI: 10.1007/s00115-014-4115-6.
2. Falkai, P., Rossner, M. J., Schulze, T. G., Hasan, A., Brzozka, M. M., Malchow, B., . . . Schmitt, A. (2015). *Kraepelin revisited: schizophrenia from degeneration to failed regeneration*. Molecular Psychiatry, 20 (6), SS. 671-676, DOI: 10.1038/mp.2015.35.
3. Woo, T. U. (2014). *Neurobiology of schizophrenia onset*. Current Topics in Behavioral Neurosciences, 16, SS. 267-295, DOI: 10.1007/7854_2013_243.
4. Tajima-Pozo, K., De Castro Oller, M. J., Lewczuk, A. und Montanes-Rada, F. (2015). *Understanding the direct and indirect costs of patients with schizophrenia*. F1000 Research, 4, SS. 182, DOI: 10.12688/f1000research.6699.2.
5. Harrison, P. J. (1999). *The neuropathology of schizophrenia. A critical review of the data and their interpretation*. Brain, 122 SS. 593-624.
6. Gaebel, W. und Wölwer, W. (2010). *Schizophrenie: Gesundheitsberichterstattung des Bundes*. Berlin: Robert Koch-Institut, SS. 1-39.
7. Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics, C. (2014). *Biological insights from 108 schizophrenia-associated genetic loci*. Nature, 511 (7510), SS. 421-427, DOI: 10.1038/nature13595.
8. Linn, C.-C. und Huang, T.-L. (2017). *Epigenetic Biomarkers in Neuropsychiatric Disorders*. In: Yasui, D., Peedicayil, J. und Grayson, D.

-
- (Hrsg.), *Neuropsychiatric Disorders and Epigenetics* (SS: 35-56). Elsevier. DOI: 10.1016/B978-0-12-800226-1.00003-4.
9. Lieb, K. (2012). *Schizophrenie und andere psychotische Störungen* In: Lieb, K., Frauenknecht, S., Brunnhuber, S. und Wewetzer, C. (Hrsg.), *Intensivkurs Psychiatrie und Psychotherapie* (SS: 177-202). München: Elsevier Urban und Fischer.
 10. Tandon, R., Nasrallah, H. A. und Keshavan, M. S. (2009). *Schizophrenia, "just the facts" 4. Clinical features and conceptualization*. Schizophrenia Research, 110 (1-3), SS. 1-23, DOI: 10.1016/j.schres.2009.03.005.
 11. Pu, S., Nakagome, K., Itakura, M., Iwata, M., Nagata, I. und Kaneko, K. (2017). *Association of fronto-temporal function with cognitive ability in schizophrenia*. Scientific Reports, 7, SS. 42858, DOI: 10.1038/srep42858.
 12. Schmitt, A., Martins-De-Souza, D., Akbarian, S., Cassoli, J. S., Ehrenreich, H., Fischer, A., . . . Members of The, W. T. F. O. B. M. (2016). *Consensus paper of the WFSBP Task Force on Biological Markers: Criteria for biomarkers and endophenotypes of schizophrenia, part III: Molecular mechanisms*. The World Journal of Biological Psychiatry, SS. 1-27, DOI: 10.1080/15622975.2016.1224929.
 13. Tohid, H., Faizan, M. und Faizan, U. (2015). *Alterations of the occipital lobe in schizophrenia*. Neurosciences, 20 (3), SS. 213-224, DOI: 10.17712/nsj.2015.3.20140757.
 14. Saß, H., Wittchen, H.-U. und Zaudig, M. (1998). *Diagnostisches und Statistisches Manual Psychischer Störungen DSM-IV*. 2. Auflage.
 15. Frey, S. (2014). *The economic burden of schizophrenia in Germany: a population-based retrospective cohort study using genetic matching*. European Psychiatry, 29 (8), SS. 479-489, DOI: 10.1016/j.eurpsy.2014.04.003.
-

16. Tandon, R., Keshavan, M. S. und Nasrallah, H. A. (2008). *Schizophrenia, "just the facts" what we know in 2008. 2. Epidemiology and etiology.* Schizophrenia Research, 102 (1-3), SS. 1-18, DOI: 10.1016/j.schres.2008.04.011.
17. Tandon, R., Nasrallah, H. A. und Keshavan, M. S. (2010). *Schizophrenia, "just the facts" 5. Treatment and prevention. Past, present, and future.* Schizophrenia Research, 122 (1-3), SS. 1-23, DOI: 10.1016/j.schres.2010.05.025.
18. Schmitt, A. und Falkai, P. (2015). *Negative symptoms and therapy strategies in schizophrenia.* European Archives of Psychiatry and Clinical Neurosciences, 265 (7), SS. 541-542, DOI: 10.1007/s00406-015-0637-6.
19. Andreasen, N. C., Nopoulos, P., Magnotta, V., Pierson, R., Ziebell, S. und Ho, B. C. (2011). *Progressive brain change in schizophrenia: a prospective longitudinal study of first-episode schizophrenia.* Biological Psychiatry, 70 (7), SS. 672-679, DOI: 10.1016/j.biopsych.2011.05.017.
20. Bakhshi, K. und Chance, S. A. (2015). *The neuropathology of schizophrenia: A selective review of past studies and emerging themes in brain structure and cytoarchitecture.* Neuroscience, 303, SS. 82-102, DOI: 10.1016/j.neuroscience.2015.06.028.
21. Keshavan, M. S., Tandon, R., Boutros, N. N. und Nasrallah, H. A. (2008). *Schizophrenia, "just the facts": what we know in 2008 Part 3: neurobiology.* Schizophrenia Research, 106 (2-3), SS. 89-107, DOI: 10.1016/j.schres.2008.07.020.
22. Heinz, A. und Weinberger, D. R. (2000). *Schizophrenie: Die neurobiologische Entwicklungshypothese.* In: Helmchen, H., Henn, F., Lauter, H. und Sartorius, N. (Hrsg.), *Schizophrenie und affektive Störungen* (SS: 89-103). Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag.

-
23. Mitelman, S. A., Shihabuddin, L., Brickman, A. M., Hazlett, E. A. und Buchsbaum, M. S. (2003). *MRI assessment of gray and white matter distribution in Brodmann's areas of the cortex in patients with schizophrenia with good and poor outcomes*. American Journal of Psychiatry, 160 (12), SS. 2154-2168, DOI: 10.1176/appi.ajp.160.12.2154.
 24. Lawrie, S. M., Whalley, H., Kestelman, J. N., Abukmeil, S. S., Byrne, M., Hodges, A., . . . Johnstone, E. C. (1999). *Magnetic resonance imaging of brain in people at high risk of developing schizophrenia*. Lancet, 353 (9146), SS. 30-33, DOI: 10.1016/S0140-6736(98)06244-8.
 25. Delisi, L. E., Sakuma, M., Maurizio, A. M., Relja, M. und Hoff, A. L. (2004). *Cerebral ventricular change over the first 10 years after the onset of schizophrenia*. Psychiatry Research, 130 (1), SS. 57-70, DOI: 10.1016/j.psychresns.2003.08.004.
 26. Heckers, S. (1997). *Neuropathology of schizophrenia: cortex, thalamus, basal ganglia, and neurotransmitter-specific projection systems*. Schizophrenia Bulletin, 23 (3), SS. 403-421.
 27. Wang, C., Aleksic, B. und Ozaki, N. (2015). *Glia-related genes and their contribution to schizophrenia*. Psychiatry and Clinical Neurosciences, 69 (8), SS. 448-461, DOI: 10.1111/pcn.12290.
 28. Huppelsberg, J. und Walter, K. (2009). *Allgemeine Neurophysiologie*. (Hrsg.), *Kurzlehrbuch Physiologie* (SS: 227-244). Stuttgart: Thieme Verlag. DOI: 10.1055/b-002-21522.
 29. Jakel, S. und Dimou, L. (2017). *Glial Cells and Their Function in the Adult Brain: A Journey through the History of Their Ablation*. Frontiers in Cellular Neuroscience, 11 (24), DOI: 10.3389/fncel.2017.00024.
 30. Herculano-Houzel, S. (2014). *The glia/neuron ratio: how it varies uniformly across brain structures and species and what that means for*
-

- brain physiology and evolution*. Glia, 62 (9), SS. 1377-1391, DOI: 10.1002/glia.22683.
31. Azevedo, F. A., Carvalho, L. R., Grinberg, L. T., Farfel, J. M., Ferretti, R. E., Leite, R. E., . . . Herculano-Houzel, S. (2009). *Equal numbers of neuronal and nonneuronal cells make the human brain an isometrically scaled-up primate brain*. Journal of Comparative Neurology, 513 (5), SS. 532-541, DOI: 10.1002/cne.21974.
32. Pelvig, D. P., Pakkenberg, H., Stark, A. K. und Pakkenberg, B. (2008). *Neocortical glial cell numbers in human brains*. Neurobiology of Aging, 29 (11), SS. 1754-1762, DOI: 10.1016/j.neurobiolaging.2007.04.013.
33. Jansen, A. H., Reits, E. A. und Hol, E. M. (2014). *The ubiquitin proteasome system in glia and its role in neurodegenerative diseases*. Frontiers in Molecular Neuroscience, 7 (73), DOI: 10.3389/fnmol.2014.00073.
34. Benes, F. M. (1997). *Is there evidence for neuronal loss in schizophrenia?* International Review of Psychiatry, 9 (4), SS. 429-436, DOI: 10.1080/09540269775295.
35. Dorph-Petersen, K. A., Pierri, J. N., Wu, Q., Sampson, A. R. und Lewis, D. A. (2007). *Primary visual cortex volume and total neuron number are reduced in schizophrenia*. Journal of Comparative Neurology, 501 (2), SS. 290-301, DOI: 10.1002/cne.21243.
36. Falkai, P., Malchow, B., Wetzstein, K., Nowastowski, V., Bernstein, H. G., Steiner, J., . . . Schmitt, A. (2016). *Decreased Oligodendrocyte and Neuron Number in Anterior Hippocampal Areas and the Entire Hippocampus in Schizophrenia: A Stereological Postmortem Study*. Schizophrenia Bulletin, 42 Suppl 1, SS. 4-12, DOI: 10.1093/schbul/sbv157.

-
37. Thune, J. J., Uylings, H. B. und Pakkenberg, B. (2001). *No deficit in total number of neurons in the prefrontal cortex in schizophrenics*. Journal of Psychiatric Research, 35 (1), SS. 15-21.
38. Weinberger, D. R., Egan, M. F., Bertolino, A., Callicott, J. H., Mattay, V. S., Lipska, B. K., . . . Goldberg, T. E. (2001). *Prefrontal neurons and the genetics of schizophrenia*. Biological Psychiatry, 50 (11), SS. 825-844.
39. Falkai, P., Steiner, J., Malchow, B., Shariati, J., Knaus, A., Bernstein, H. G., . . . Schmitt, A. (2016). *Oligodendrocyte and Interneuron Density in Hippocampal Subfields in Schizophrenia and Association of Oligodendrocyte Number with Cognitive Deficits*. Frontiers in Cellular Neuroscience, 10 (78), DOI: 10.3389/fncel.2016.00078.
40. Schmitt, A., Steyskal, C., Bernstein, H. G., Schneider-Axmann, T., Parlapani, E., Schaeffer, E. L., . . . Falkai, P. (2009). *Stereologic investigation of the posterior part of the hippocampus in schizophrenia*. Acta Neuropathologica, 117 (4), SS. 395-407, DOI: 10.1007/s00401-008-0430-y.
41. Iwamoto, K., Bundo, M., Yamada, K., Takao, H., Iwayama-Shigeno, Y., Yoshikawa, T. und Kato, T. (2005). *DNA methylation status of SOX10 correlates with its downregulation and oligodendrocyte dysfunction in schizophrenia*. Journal of Neuroscience, 25 (22), SS. 5376-5381, DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0766-05.2005.
42. Konrad, A. und Winterer, G. (2008). *Disturbed structural connectivity in schizophrenia primary factor in pathology or epiphenomenon?* Schizophrenia Bulletin, 34 (1), SS. 72-92, DOI: 10.1093/schbul/sbm034.
43. Bernstein, H. G., Steiner, J. und Bogerts, B. (2009). *Glial cells in schizophrenia: pathophysiological significance and possible consequences for therapy*. Expert Review of Neurotherapeutics, 9 (7), SS. 1059-1071, DOI: 10.1586/ern.09.59.
-

44. Schmitt, A., Parlapani, E. und Falkai, P. (2009). *Ist die Schizophrenie eine Strörung der Synpto- und/oder der Neurogenese?* Journal für Neurologie, Neurochirurgie und Psychiatrie, 10 (2), SS. 72-76.
45. Fuster, J. M. (2001). *The prefrontal cortex - an update: time is of the essence.* Neuron, 30 (2), SS. 319-333.
46. Vogeley, K., Tepest, R., Schneider-Axmann, T., Hutte, H., Zilles, K., Honer, W. G. und Falkai, P. (2003). *Automated image analysis of disturbed cytoarchitecture in Brodmann area 10 in schizophrenia.* Schizophrenia Research, 62 (1-2), SS. 133-140.
47. Dumontheil, I., Burgess, P. W. und Blakemore, S. J. (2008). *Development of rostral prefrontal cortex and cognitive and behavioural disorders.* Developmental Medicine & Child Neurology, 50 (3), SS. 168-181, DOI: 10.1111/j.1469-8749.2008.02026.x.
48. Walter, S. und Meier, B. (2014). *How important is importance for prospective memory? A review.* Frontiers in Psychology, 5, SS. 657, DOI: 10.3389/fpsyg.2014.00657.
49. Hazlett, E. A., Buchsbaum, M. S., Haznedar, M. M., Newmark, R., Goldstein, K. E., Zelmanova, Y., . . . Siever, L. J. (2008). *Cortical gray and white matter volume in unmedicated schizotypal and schizophrenia patients.* Schizophrenia Research, 101 (1-3), SS. 111-123, DOI: 10.1016/j.schres.2007.12.472.
50. Garrison, J. R., Fernandez-Egea, E., Zaman, R., Agius, M. und Simons, J. S. (2017). *Reality monitoring impairment in schizophrenia reflects specific prefrontal cortex dysfunction.* NeuroImage: Clinical, 14, SS. 260-268, DOI: 10.1016/j.nicl.2017.01.028.
51. Onitsuka, T., Mccarley, R. W., Kuroki, N., Dickey, C. C., Kubicki, M., Demeo, S. S., . . . Shenton, M. E. (2007). *Occipital lobe gray matter*

-
- volume in male patients with chronic schizophrenia: A quantitative MRI study.* Schizophrenia Research, 92 (1-3), SS. 197-206, DOI: 10.1016/j.schres.2007.01.027.
52. Siedentopf, C. (2013). *Brodmann-Areale in lateraler und medialer Darstellung.* Aufgerufen am: 05.08.2017, von URL: http://www.fmri-easy.de/brodmann_bild_ana-Dateien/image007.gif.
 53. Pritzel, M. (2000). *Dopamin und seine Bedeutung für unser Verhalten.* Schriftenreihe Universität Landau-Neurowissenschaftliches Seminar, 3.
 54. Moises, H. W. und Gottesman, I. I. (2000). *Genetische Risikofaktoren und Schizophrenie.* In: Helmchen, H., Henn, F., Lauter, H. und Sartorius, N. (Hrsg.), *Schizophrene und affektive Störungen* (SS: 71-88). Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag.
 55. Grimm, T. (2006). *Formale Genetik.* In: Murken, J., Grimm, T. und Elke, H.-F. (Hrsg.), *Humangenetik* (SS: 251-252). Thieme Verlag. DOI: 10.1055/b-0034-24064.
 56. Visscher, P. M., Hill, W. G. und Wray, N. R. (2008). *Heritability in the genomics era--concepts and misconceptions.* Nature Reviews Genetics, 9 (4), SS. 255-266, DOI: 10.1038/nrg2322.
 57. Lee, R. und Avramopoulos, D. (2014). *Introduction to Epigenetics in Psychiatry.* In: Peedicayil, J., Grayson, D.R. und Avramopoulos, D. (Hrsg.), *Epigenetics in Psychiatry* (SS: 3-25). Elsevier. DOI: 10.1016/B978-0-12-417114-5.00001-2.
 58. Jiang, Z., Du, C., Jablensky, A., Liang, H., Lu, Z., Ma, Y. und Teo, K. L. (2014). *Analysis of schizophrenia data using a nonlinear threshold index logistic model.* PLoS One, 9 (10), SS. e109454, DOI: 10.1371/journal.pone.0109454.
-

59. Ingraham, L. J. und Kety, S. S. (2000). *Adoption studies of schizophrenia*. American Journal of Medical Genetics, 97 (1), SS. 18-22.
60. Power, R. A., Verweij, K. J., Zuhair, M., Montgomery, G. W., Henders, A. K., Heath, A. C., . . . Martin, N. G. (2014). *Genetic predisposition to schizophrenia associated with increased use of cannabis*. Molecular Psychiatry, 19 (11), SS. 1201-1204, DOI: 10.1038/mp.2014.51.
61. Sullivan, P. F., Kendler, K. S. und Neale, M. C. (2003). *Schizophrenia as a complex trait: evidence from a meta-analysis of twin studies*. Archives of general psychiatry, 60 (12), SS. 1187-1192, DOI: 10.1001/archpsyc.60.12.1187.
62. Graw, J. (2015). *Genetik menschlicher Erkrankungen*. In: Graw, J. (Hrsg.), *Genetik* (SS: 597-666). Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag. DOI: 10.1007/978-3-662-44817-5_13.
63. Lee, S. H., Decandia, T. R., Ripke, S., Yang, J., Schizophrenia Psychiatric Genome-Wide Association Study, Consortium, International Schizophrenia, Consortium, . . . Wray, N. R. (2012). *Estimating the proportion of variation in susceptibility to schizophrenia captured by common SNPs*. Nature Genetics, 44 (3), SS. 247-250, DOI: 10.1038/ng.1108.
64. Nishioka, M., Bundo, M., Kasai, K. und Iwamoto, K. (2012). *DNA methylation in schizophrenia: progress and challenges of epigenetic studies*. Genome Medicine, 4 (12), SS. 96, DOI: 10.1186/gm397.
65. Messias, E. L., Chen, C. Y. und Eaton, W. W. (2007). *Epidemiology of schizophrenia: review of findings and myths*. Psychiatric Clinics of North America, 30 (3), SS. 323-338, DOI: 10.1016/j.psc.2007.04.007.
66. Chae, S., Sim, M., Lim, M., Na, J. und Kim, D. (2015). *Multivariate Analysis of Relationship between Childhood Trauma and Psychotic*

- Symptoms in Patients with Schizophrenia*. Psychiatry Investigation, 12 (3), SS. 397-401, DOI: 10.4306/pi.2015.12.3.397.
67. Daskalakis, N. P. und Binder, E. B. (2015). *Schizophrenia in the spectrum of gene-stress interactions: the FKBP5 example*. Schizophrenia Bulletin, 41 (2), SS. 323-329, DOI: 10.1093/schbul/sbu189.
68. Mcgrath, J., Saha, S., Welham, J., El Saadi, O., Maccauley, C. und Chant, D. (2004). *A systematic review of the incidence of schizophrenia: the distribution of rates and the influence of sex, urbanicity, migrant status and methodology*. BMC Medicine, 2, SS. 13, DOI: 10.1186/1741-7015-2-13.
69. Martinez-Lavin, M. (2007). *Biology and therapy of fibromyalgia. Stress, the stress response system, and fibromyalgia*. Arthritis Research and Therapy, 9 (4), SS. 216, DOI: 10.1186/ar2146.
70. Provencal, N. und Binder, E. B. (2015). *The neurobiological effects of stress as contributors to psychiatric disorders: focus on epigenetics*. Current Opinion in Neurobiology, 30, SS. 31-37, DOI: 10.1016/j.conb.2014.08.007.
71. Peedicayil, J. (2014). *A Brief History of Epigenetics in Psychiatry*. In: Peedicayil, J., Grayson, D.R. und Avramopoulos, D. (Hrsg.), *Epigenetics in Psychiatry* (SS: 45-50). DOI: 10.1016/B978-0-12-417114-5.00003-6.
72. Jablensky, A. (2000). *Symptome schizophrener Störungen*. In: Helmchen, H., Henn, F. und Lauter, H.S., N. (Hrsg.), *Schizophrene und affektive Störungen* (SS: 3-51). Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag.
73. Graw, J. (2015). *Epigenetik*. In: Graw, J. (Hrsg.), *Genetik* (SS: 293-338). Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag. DOI: 10.1007/978-3-662-44817-5_13.

74. Hoffmann, A. und Spengler, D. (2017). *Environmental Factors and Epigenetics of Neuropsychiatric Disorders*. In: Yasui, D., Peedicayil, J. und Grayson, D. (Hrsg.), *Neuropsychiatric disorders and epigenetics* (SS: 9-28). Elsevier. DOI: 10.1016/B978-0-12-800226-1.00002-2.
75. Graw, J. (2015). *Was ist Genetik?* In: Graw, J. (Hrsg.), *Genetik* (SS: 1-20). Berlin, Heidelberg: Springer Spektrum. DOI: 10.1007/978-3-662-44817-5.
76. Paul, B. T. T. O. (2014). *Outline of Epigenetics*. In: Peedicayil, J., Grayson, D.R. und Avramopoulos, D. (Hrsg.), *Epigenetics in Psychiatry* (SS: 27-44). Elsevier. DOI: 10.1016/B978-0-12-417114-5.00002-4.
77. Uddin, M., Bustamante, A. und Toyokawa, S. (2014). *Epigenetic Epidemiology of Psychiatric Disorders*. In: Peedicayil, J., Grayson, D.R. und Avramopoulos, D. (Hrsg.), *Epigenetics in Psychiatry* (SS: 101-127). Elsevier. DOI: 10.1016/B978-0-12-417114-5.00006-1.
78. Walter, J. und Hümpel, A. (2016). *Einführung in die Epigenetik*. In: Heil, R., König, H., Seitz, S. und Robiński, J. (Hrsg.), *Epigenetik: Ethische, rechtliche und soziale Aspekte* (SS: 15-33). Wiesbaden: Springer Fachmedien. DOI: 10.1007/978-3-658-10037-7.
79. Bohacek, J. und Mansuy, I. M. (2013). *Epigenetic inheritance of disease and disease risk*. *Neuropsychopharmacology*, 38 (1), SS. 220-236, DOI: 10.1038/npp.2012.110.
80. Feinberg, A. P. (2008). *Epigenetics at the Epicenter of Modern Medicine*. *Journal of the American Medical Association*, 299 (11), SS. 1345-1350, DOI: 10.1001/jama.299.11.1345.
81. Manjrekar, J. (2017). *Epigenetic inheritance, prions and evolution*. *Journal of Genetics*, 96 (3), SS. 445-456.

-
82. Bernstein, B. E., Meissner, A. und Lander, E. S. (2007). *The mammalian epigenome*. Cell, 128 (4), SS. 669-681, DOI: 10.1016/j.cell.2007.01.033.
83. Jaenisch, R. und Bird, A. (2003). *Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals*. Nature Genetics, 33, SS. 245-254, DOI: 10.1038/ng1089.
84. Akbarian, S. (2014). *Epigenetic mechanisms in schizophrenia*. Dialogues in Clinical Neuroscience, 16 (3), SS. 405-417.
85. Bakulski, K. M., Halladay, A., Hu, V. W., Mill, J. und Fallin, M. D. (2016). *Epigenetic Research in Neuropsychiatric Disorders: the "Tissue Issue"*. Current behavioral neuroscience reports, 3 (3), SS. 264-274, DOI: 10.1007/s40473-016-0083-4.
86. Schmitt, A., Rujescu, D., Gawlik, M., Hasan, A., Hashimoto, K., Iceta, S., . . . Markers, W. T. F. O. B. (2016). *Consensus paper of the WFSBP Task Force on Biological Markers: Criteria for biomarkers and endophenotypes of schizophrenia part II: Cognition, neuroimaging and genetics*. The World Journal of Biological Psychiatry, 17 (6), SS. 406-28, DOI: 10.1080/15622975.2016.1183043.
87. Peedicayil, J., Grayson, D. R. und Yasui, D. (2017). *Introduction to Neuropsychiatric Disorders and Epigenetics*. In: Yasui, D., Peedicayil, J. und Grayson, D.R. (Hrsg.), *Neuropsychiatric Disorders and Epigenetics* (SS: 3-6). Elsevier. DOI: 10.1016/B978-0-12-800226-1.00001-0.
88. Iwamoto, K., Bundo, M., Ueda, J., Oldham, M. C., Ukai, W., Hashimoto, E., . . . Kato, T. (2011). *Neurons show distinctive DNA methylation profile and higher interindividual variations compared with non-neurons*. Genome Research, 21 (5), SS. 688-696, DOI: 10.1101/gr.112755.110.
89. Grayson, D. R. und Guidotti, A. (2014). *5-Methylcytosine and 5-Hydroxymethylcytosine in Psychiatric Epigenetics* In: Peedicayil, J.,
-

- Grayson, D.R. und Avramopoulos, D. (Hrsg.), *Epigenetic in Psychiatry* (SS: 209-240). Elsevier. DOI: 10.1016/B978-0-12-417114-5.00010-3.
90. Kinde, B., Gabel, H. W., Gilbert, C. S., Griffith, E. C. und Greenberg, M. E. (2015). *Reading the unique DNA methylation landscape of the brain: Non-CpG methylation, hydroxymethylation, and MeCP2*. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 112 (22), SS. 6800-6806, DOI: 10.1073/pnas.1411269112.
91. Miller, C. A. und Sweatt, J. D. (2007). *Covalent modification of DNA regulates memory formation*. Neuron, 53 (6), SS. 857-869, DOI: 10.1016/j.neuron.2007.02.022.
92. Iwamoto, K. und Kato, T. (2009). *Epigenetic profiling in schizophrenia and major mental disorders*. Neuropsychobiology, 60 (1), SS. 5-11, DOI: 10.1159/000234811.
93. Kohli, R. M. und Zhang, Y. (2013). *TET enzymes, TDG and the dynamics of DNA demethylation*. Nature, 502 (7472), SS. 472-479, DOI: 10.1038/nature12750.
94. Paul, B. und T.O., T. (2014). *Outline of Epigenetics*. In: Peedicayil, J., Grayson, D.R. und Avramopoulos, D. (Hrsg.), *Epigenetics in Psychiatry* (SS: 27-44). Elsevier. DOI: 10.1016/B978-0-12-417114-5.00002-4.
95. Siegmund, K. D., Connor, C. M., Campan, M., Long, T. I., Weisenberger, D. J., Biniszkiewicz, D., . . . Akbarian, S. (2007). *DNA methylation in the human cerebral cortex is dynamically regulated throughout the life span and involves differentiated neurons*. PLoS One, 2 (9), SS. e895, DOI: 10.1371/journal.pone.0000895.
96. Ishida, M. und Moore, G. E. (2013). *The role of imprinted genes in humans*. Molecular Aspects of Medicine, 34 (4), SS. 826-840, DOI: 10.1016/j.mam.2012.06.009.

-
97. Dupont, C., Armant, D. R. und Brenner, C. A. (2009). *Epigenetics: definition, mechanisms and clinical perspective*. Seminars in Reproductive Medicine, 27 (5), SS. 351-357, DOI: 10.1055/s-0029-1237423.
98. Robertson, K. D. und Jones, P. A. (2000). *DNA methylation: past, present and future directions*. Carcinogenesis, 21 (3), SS. 461-467.
99. Klengel, T. und Binder, E. B. (2015). *FKBP5 allele-specific epigenetic modification in gene by environment interaction*. Neuropsychopharmacology, 40 (1), SS. 244-246, DOI: 10.1038/npp.2014.208.
100. Klengel, T., Mehta, D., Anacker, C., Rex-Haffner, M., Pruessner, J. C., Pariante, C. M., . . . Binder, E. B. (2013). *Allele-specific FKBP5 DNA demethylation mediates gene-childhood trauma interactions*. Nature Neuroscience, 16 (1), SS. 33-41, DOI: 10.1038/nn.3275.
101. Zannas, A. S., Wiechmann, T., Gassen, N. C. und Binder, E. B. (2016). *Gene-Stress-Epigenetic Regulation of FKBP5: Clinical and Translational Implications*. Neuropsychopharmacology, 41 (1), SS. 261-274, DOI: 10.1038/npp.2015.235.
102. Binder, E. B. (2009). *The role of FKBP5, a co-chaperone of the glucocorticoid receptor in the pathogenesis and therapy of affective and anxiety disorders*. Psychoneuroendocrinology, 34 Suppl 1, SS. S186-195, DOI: 10.1016/j.psyneuen.2009.05.021.
103. Graw, J. (2015). *Molekulare Struktur und Regulation eukaryotischer Gene*. In: Graw, J. (Hrsg.), *Genetik* (SS: 261-290). Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag. DOI: 10.1007/978-3-662-44817-5_7.
104. Labontè, B. und Lutz, P.-E. T., G. (2014). *The Epigenetics of Suicide: The Critical Impact of the Environment on Epigenetic Regulation in Suicide*. In: Peedicayil, J., Grayson, D.R. und Avramopoulos, D. (Hrsg.),
-

- Epigenetics in Psychiatry* (SS: 303-324). Elsevier. DOI: 10.1016/B978-0-12-417114-5.00015-2.
105. Willyard, C. (2018). *New human gene tally reignites debate*. *Nature*, 558 (7710), SS. 354-355, DOI: 10.1038/d41586-018-05462-w.
106. Venter, J. C., Adams, M. D., Myers, E. W., Li, P. W., Mural, R. J., Sutton, G. G., . . . Zhu, X. (2001). *The sequence of the human genome*. *Science*, 291 (5507), SS. 1304-1351, DOI: 10.1126/science.1058040.
107. Venter, J. C., Smith, H. O. und Adams, M. D. (2015). *The Sequence of the Human Genome*. *Clinical Chemistry*, 61 (9), SS. 1207-1208, DOI: 10.1373/clinchem.2014.237016.
108. Peedicayil, J. und Beveridge, N. J. (2014). *Non-coding RNAs and Psychiatric Disorders*. In: Peedicayil, J., Grayson, D.R. und Avramopoulos, D. (Hrsg.), *Epigenetics in Psychiatry* (SS: 253-264). Elsevier. DOI: 10.1016/B978-0-12-417114-5.00012-7.
109. Kraus, T. F., Greiner, A., Guibourt, V. und Kretzschmar, H. A. (2015). *Long non-coding RNA normalisers in human brain tissue*. *Journal of Neural Transmission*, 122 (7), SS. 1045-1054, DOI: 10.1007/s00702-014-1352-6.
110. Liu, G., Mattick, J. S. und Taft, R. J. (2013). *A meta-analysis of the genomic and transcriptomic composition of complex life*. *Cell Cycle*, 12 (13), SS. 2061-2072, DOI: 10.4161/cc.25134.
111. Mattick, J. S. (2001). *Non-coding RNAs: the architects of eukaryotic complexity*. *EMBO Reports*, 2 (11), SS. 986-991, DOI: 10.1093/embo-reports/kve230.

-
112. Szafranski, K., Abraham, K. J. und Mekhail, K. (2015). *Non-coding RNA in neural function, disease, and aging*. *Frontiers in Genetics*, 6, SS. 87, DOI: 10.3389/fgene.2015.00087.
113. Wu, P., Zuo, X., Deng, H., Liu, X., Liu, L. und Ji, A. (2013). *Roles of long noncoding RNAs in brain development, functional diversification and neurodegenerative diseases*. *Brain Research Bulletin*, 97, SS. 69-80, DOI: 10.1016/j.brainresbull.2013.06.001.
114. Lozada-Chavez, I., Stadler, P. F. und Prohaska, S. J. (2011). *"Hypothesis for the modern RNA world": a pervasive non-coding RNA-based genetic regulation is a prerequisite for the emergence of multicellular complexity*. *Origins of Life and Evolution of Biospheres*, 41 (6), SS. 587-607, DOI: 10.1007/s11084-011-9262-1.
115. Iyer, M. K., Niknafs, Y. S., Malik, R., Singhal, U., Sahu, A., Hosono, Y., . . . Chinnaiyan, A. M. (2015). *The landscape of long noncoding RNAs in the human transcriptome*. *Nature Genetics*, 47 (3), SS. 199-208, DOI: 10.1038/ng.3192.
116. Kung, J. T., Colognori, D. und Lee, J. T. (2013). *Long noncoding RNAs: past, present, and future*. *Genetics*, 193 (3), SS. 651-669, DOI: 10.1534/genetics.112.146704.
117. Derrien, T., Johnson, R., Bussotti, G., Tanzer, A., Djebali, S., Tilgner, H., . . . Guigo, R. (2012). *The GENCODE v7 catalog of human long noncoding RNAs: analysis of their gene structure, evolution, and expression*. *Genome Research*, 22 (9), SS. 1775-1789, DOI: 10.1101/gr.132159.111.
118. Van De, V., Ii, Gordebeke, P. M., Khoshab, N., Tiesinga, P. H., Buitelaar, J. K., Kozicz, T., . . . Glennon, J. C. (2013). *Long non-coding RNAs in neurodevelopmental disorders*. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 6, SS. 53, DOI: 10.3389/fnmol.2013.00053.
-

119. Harries, L. W. (2012). *Long non-coding RNAs and human disease*. Biochemical Society Transactions, 40 (4), SS. 902-906, DOI: 10.1042/BST20120020.
120. Barry, G., Briggs, J. A., Vanichkina, D. P., Poth, E. M., Beveridge, N. J., Ratnu, V. S., . . . Mattick, J. S. (2014). *The long non-coding RNA Gomafu is acutely regulated in response to neuronal activation and involved in schizophrenia-associated alternative splicing*. Molecular Psychiatry, 19 (4), SS. 486-494, DOI: 10.1038/mp.2013.45.
121. Merelo, V., Durand, D., Lescalette, A. R., Vrana, K. E., Hong, L. E., Faghihi, M. A. und Bellon, A. (2015). *Associating schizophrenia, long non-coding RNAs and neurostructural dynamics*. Frontiers in Molecular Neuroscience, 8, SS. 57, DOI: 10.3389/fnmol.2015.00057.
122. Jiang, Y., Matevossian, A., Huang, H. S., Straubhaar, J. und Akbarian, S. (2008). *Isolation of neuronal chromatin from brain tissue*. BMC Neuroscience, 9 (42), DOI: 10.1186/1471-2202-9-42.
123. Mullen, R. J., Buck, C. R. und Smith, A. M. (1992). *NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates*. Development, 116 (1), SS. 201-211.
124. Davey, H. M. und Kell, D. B. (1996). *Flow cytometry and cell sorting of heterogeneous microbial populations: the importance of single-cell analyses*. Microbiology Reviews, 60 (4), SS. 641-496.
125. Yuan, J. S., Reed, A., Chen, F. und Stewart, C. N., Jr. (2006). *Statistical analysis of real-time PCR data*. BMC Bioinformatics, 7, SS. 85, DOI: 10.1186/1471-2105-7-85.
126. Bortz, J. und Lienert, G. (1998). *Testmethoden für Rangdaten*. In: Bortz, J. und Lienert, G. (Hrsg.), *Kurzgefaßte Statistik für die klinische Forschung - Ein praktischer Leitfaden für die klinische Forschung* (SS: 121-122, 126-

- 135, 349-360). Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag. DOI: 10.1007/978-3-662-22078-8.
127. Nanodrop Technologies, I. (2007). *ND-1000 Spectrophotometer; V3.5 User's Manual* Aufgerufen am: 05.08.2017, von URL: <http://www.albany.edu/genomics/microarray/manuals/nd-1000-users-manual.pdf>.
128. Schroeder, A., Mueller, O., Stocker, S., Salowsky, R., Leiber, M., Gassmann, M., . . . Ragg, T. (2006). *The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements*. BMC Molecular Biology, 7, SS. 3, DOI: 10.1186/1471-2199-7-3.
129. Fleige, S. P., Michael (2007). *Einfluss der RNA-Integrität auf die quantitative real-time RT-PCR*. Laborwelt, 8 (5), SS. 4-8.
130. Genome Scan (2017). *Hydroxymethylation*. Aufgerufen am: 02.09.2017, von URL: <https://www.genomescan.nl/portfolio/hydroxymethylation/>.
131. Mullis, K. B. und Faloona, F. A. (1987). *Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction*. Methods in Enzymology, 155, SS. 335-350.
132. Graw, J. (2015). *Molekulare Grundlagen der Vererbung*. In: Graw, J. (Hrsg.), *Genetik* (SS: 49-54). Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag. DOI: 10.1007/978-3-662-44817-5_2.
133. Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A. R. (1977). *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors*. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 74 (12), SS. 5463-5467.
134. Eberhard Karls Univeristät Tübingen (2016). *Umrechnungstabellen*. Aufgerufen am: 05.08.2017, von URL: https://www.medizin.uni-tuebingen.de/Patienten/Institute/Med_Virologie+und+Epidemiologie+der
-

+Viruskrankheiten/Sektion+Experimentelle+Virologie/Aktuelle+Forschungsprojekte/Umrechnungstabellen.html.

135. Miller, D. N., Bryant, J. E., Madsen, E. L. und Ghiorse, W. C. (1999). *Evaluation and optimization of DNA extraction and purification procedures for soil and sediment samples*. Applied Environmental Microbiology, 65 (11), SS. 4715-4724.
136. Michigan, U. O. *DNA-Sequencing Core-Interpretation of Sequencing Chromatograms*. Aufgerufen am: 05.08.2017, von URL: <https://seqcore.brcf.med.umich.edu/sites/default/files/html/interpret.html>.
137. Warnecke, P. M., Stirzaker, C., Song, J., Grunau, C., Melki, J. R. und Clark, S. J. (2002). *Identification and resolution of artifacts in bisulfite sequencing*. Methods, 27 (2), SS. 101-107.
138. Genereux, D. P., Johnson, W. C., Burden, A. F., Stoger, R. und Laird, C. D. (2008). *Errors in the bisulfite conversion of DNA: modulating inappropriate- and failed-conversion frequencies*. Nucleic Acids Research, 36 (22), SS. e150, DOI: 10.1093/nar/gkn691.
139. Pfaffl, M. W., *Livestock Transcriptomics: Quantitative mRNA Analytics in Molecular Endocrinology and Physiology*. Habilitationsschrift, 2003, Technische Universität München: Faculty Center of Life and Food Sciences, Technische Universität München, URL: <http://www.gene-quantification.de/habilitation-pfaffl-livestock-transcriptomics.pdf>.
140. Pfaffl, M. W. (2004). *Quantification strategies in real-time PCR*. In: Bustin, S. (Hrsg.), *A-Z of quantitative PCR* (SS: 87-112). La Jolla, CA, USA: International University line.
141. Karlen, Y., McNair, A., Perseguers, S., Mazza, C. und Mermod, N. (2007). *Statistical significance of quantitative PCR*. BMC Bioinformatics, 8, SS. 131, DOI: 10.1186/1471-2105-8-131.

142. Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., . . . Wittwer, C. T. (2009). *The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments*. *Clinical Chemistry*, 55 (4), SS. 611-622, DOI: 10.1373/clinchem.2008.112797.
143. Tichopad, A., Didier, A. und Pfaffl, M. W. (2004). *Inhibition of real-time RT-PCR quantification due to tissue-specific contaminants*. *Molecular and Cellular Probes*, 18 (1), SS. 45-50, DOI: 10.1016/j.mcp.2003.09.001.
144. Ltd., R. D. (2008). *LightCycler® 480 Instrument, Operator's Manual, Software Version 1.5*. Aufgerufen am: 05.08.2017, von URL: <http://icob.sinica.edu.tw/pubweb/bio-chem/Core%20Facilities/Data/R401-core/LightCycler480%20II Manual V1.5.pdf>.
145. Pfaffl, M. W. (2006). *Neue Entwicklungen in der post-qPCR-Datenentwicklung*. *Laborwelt*, 7, SS. 10-13.
146. Pfaffl, M. W., Horgan, G. W. und Dempfle, L. (2002). *Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR*. *Nucleic Acids Research*, 30 (9), SS. e36.
147. Pfaffl, M. W. 2004. *Determination of real-time PCR efficiency- an overview*. In: 1st International qPCR Symposium and Application Workshop: Freising-Weihenstephan.
148. Schmittgen, T. D. und Livak, K. J. (2008). *Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method*. *Nature Protocols*, 3 (6), SS. 1101-1108.
149. Kubista, M. S., Radek; Tichopad, Ales; Bergkvist, Anders; Lindh, Daniel; Forootan, Amin (2007). *The Prime Technique*. G.I.T: Laboratory Journal, 9-10, SS. 33-35.

150. Livak, K. J. und Schmittgen, T. D. (2001). *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method*. *Methods*, 25 (4), SS. 402-408, DOI: 10.1006/meth.2001.1262.
151. Pfaffl, M. W. (2004). *Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung*. *Biospektrum*, 1, SS. 92-95.
152. Pfaffl, M. W. (2012). *Quantification Strategies in Real-time Polymerase Chain Reaction*. In: Fillion, M. (Hrsg.), *Quantitative Real-time PCR in Applied Microbiology* (SS: 53-61). Caister Academic Press.
153. Andersen, C. L., Jensen, J. L. und Orntoft, T. F. (2004). *Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets*. *Cancer Research*, 64 (15), SS. 5245-5250, DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-04-0496.
154. Latham, G. J. (2010). *Normalization of microRNA quantitative RT-PCR data in reduced scale experimental designs*. *Methods in Molecular Biology*, 667, SS. 19-31, DOI: 10.1007/978-1-60761-811-9_2.
155. Bortz, J. und Lienert, G. (1998). *Einführung in die Interferenzstatistik*. In: Bortz, J. und Lienert, G. (Hrsg.), *Kurzgefaßte Statistik für die klinische Forschung- Ein praktischer Leitfaden für die Analyse kleiner Stichproben* (SS: 1-50). Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag. DOI: 10.1007/978-3-662-22078-8.
156. Biau, D. J., Jolles, B. M. und Porcher, R. (2010). *P value and the theory of hypothesis testing: an explanation for new researchers*. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 468 (3), SS. 885-892, DOI: 10.1007/s11999-009-1164-4.

-
157. Cheng, Q. X. (2011). *Long Noncoding RNA Database v2.0*. Aufgerufen am: 05.08.2017, von URL: <http://lncrna.com/>.
158. Maclary, E., Hinten, M., Harris, C. und Kalantry, S. (2013). *Long nonoding RNAs in the X-inactivation center*. Chromosome Research, 21 (6-7), SS. 601-614, DOI: 10.1007/s10577-013-9396-2.
159. Kohtz, J. D. und Berghoff, E. G. (2010). *Regulatory long non-coding RNAs and neuronal disorders*. Physiology & Behavior, 100 (3), SS. 250-254, DOI: 10.1016/j.physbeh.2010.01.015.
160. Candeias, M. M., Malbert-Colas, L., Powell, D. J., Daskalogianni, C., Maslon, M. M., Naski, N., . . . Fahraeus, R. (2008). *P53 mRNA controls p53 activity by managing Mdm2 functions*. Nature Cell Biology, 10 (9), SS. 1098-1105, DOI: 10.1038/ncb1770.
161. Liu, Q., Huang, J., Zhou, N., Zhang, Z., Zhang, A., Lu, Z., . . . Mo, Y. Y. (2013). *LncRNA loc285194 is a p53-regulated tumor suppressor*. Nucleic Acids Research, 41 (9), SS. 4976-4987, DOI: 10.1093/nar/gkt182.
162. Shan, K., Jiang, Q., Wang, X. Q., Wang, Y. N., Yang, H., Yao, M. D., . . . Yan, B. (2016). *Role of long non-coding RNA-RNCR3 in atherosclerosis-related vascular dysfunction*. Cell Death and Disease, 7 (6), SS. e2248, DOI: 10.1038/cddis.2016.145.
163. Abarrategui, I. und Krangel, M. S. (2007). *Noncoding transcription controls downstream promoters to regulate T-cell receptor alpha recombination*. The EMBO Journal, 26 (20), SS. 4380-4390, DOI: 10.1038/sj.emboj.7601866.
164. Wang, K. C. und Chang, H. Y. (2011). *Molecular mechanisms of long noncoding RNAs*. Molecular Cell, 43 (6), SS. 904-914, DOI: 10.1016/j.molcel.2011.08.018.
-

165. Gibb, E. A., Vucic, E. A., Enfield, K. S., Stewart, G. L., Lonergan, K. M., Kennett, J. Y., . . . Lam, W. L. (2011). *Human cancer long non-coding RNA transcriptomes*. PLoS One, 6 (10), SS. e25915, DOI: 10.1371/journal.pone.0025915.
166. Johnsson, P., Lipovich, L., Grander, D. und Morris, K. V. (2014). *Evolutionary conservation of long non-coding RNAs; sequence, structure, function*. Biochimica et Biophysica Acta, 1840 (3), SS. 1063-1071, DOI: 10.1016/j.bbagen.2013.10.035.
167. Beniaminov, A., Westhof, E. und Krol, A. (2008). *Distinctive structures between chimpanzee and human in a brain noncoding RNA*. RNA, 14 (7), SS. 1270-1275, DOI: 10.1261/rna.1054608.
168. Cassidy, S. B. (1997). *Prader-Willi syndrome*. Journal of Medical Genetic, 34 (11), SS. 917-923.
169. Wevrick, R. und Francke, U. (1997). *An imprinted mouse transcript homologous to the human imprinted in Prader-Willi syndrome (IPW) gene*. Human Molecular Genetics, 6 (2), SS. 325-332.
170. Kanduri, C. (2011). *Kcnq1ot1: a chromatin regulatory RNA*. Seminars in Cell and Developmental Biology, 22 (4), SS. 343-350, DOI: 10.1016/j.semcdb.2011.02.020.
171. Gast, M., Schroen, B., Voigt, A., Haas, J., Kuehl, U., Lassner, D., . . . Poller, W. (2016). *Long noncoding RNA MALAT1-derived mascRNA is involved in cardiovascular innate immunity*. Journal of Molecular Cell Biology, 8 (2), SS. 178-181, DOI: 10.1093/jmcb/mjw003.
172. Wilusz, J. E., Freier, S. M. und Spector, D. L. (2008). *3' end processing of a long nuclear-retained noncoding RNA yields a tRNA-like cytoplasmic RNA*. Cell, 135 (5), SS. 919-932, DOI: 10.1016/j.cell.2008.10.012.

-
173. Ma, L., Bajic, V. B. und Zhang, Z. (2013). *On the classification of long non-coding RNAs*. RNA Biology, 10 (6), SS. 925-933, DOI: 10.4161/rna.24604.
174. Blackwood, D. H., Fordyce, A., Walker, M. T., St Clair, D. M., Porteous, D. J. und Muir, W. J. (2001). *Schizophrenia and affective disorders-- cosegregation with a translocation at chromosome 1q42 that directly disrupts brain-expressed genes: clinical and P300 findings in a family*. American Journal of Human Genetics, 69 (2), SS. 428-433.
175. Feng, J., Bi, C., Clark, B. S., Mady, R., Shah, P. und Kohtz, J. D. (2006). *The Evf-2 noncoding RNA is transcribed from the Dlx-5/6 ultraconserved region and functions as a Dlx-2 transcriptional coactivator*. Genes & Development, 20 (11), SS. 1470-1484, DOI: 10.1101/gad.1416106.
176. Button, K. S., Ioannidis, J. P., Mokrysz, C., Nosek, B. A., Flint, J., Robinson, E. S. und Munafò, M. R. (2013). *Power failure: why small sample size undermines the reliability of neuroscience*. Nature Reviews Neuroscience, 14 (5), SS. 365-376, DOI: 10.1038/nrn3475.
177. Akbarian, S., Kim, J. J., Potkin, S. G., Hagman, J. O., Tafazzoli, A., Bunney, W. E., Jr. und Jones, E. G. (1995). *Gene expression for glutamic acid decarboxylase is reduced without loss of neurons in prefrontal cortex of schizophrenics*. Archives of general psychiatry, 52 (4), SS. 258-266.
178. Stark, A. K., Uylings, H. B., Sanz-Arigita, E. und Pakkenberg, B. (2004). *Glial cell loss in the anterior cingulate cortex, a subregion of the prefrontal cortex, in subjects with schizophrenia*. American Journal of Psychiatry, 161 (5), SS. 882-888, DOI: 10.1176/appi.ajp.161.5.882.
179. Uranova, N. A., Vostrikov, V. M., Vikhreva, O. V., Zimina, I. S., Kolomeets, N. S. und Orlovskaya, D. D. (2007). *The role of oligodendrocyte pathology in schizophrenia*. International Journal of
-

- Neuropsychopharmacology, 10 (4), SS. 537-545, DOI: 10.1017/S1461145707007626.
180. Vostrikov, V. M., Uranova, N. A., Rakhmanova, V. I. und Orlovskaya, D. D. (2004). *[Lowered oligodendroglial cell density in the prefrontal cortex in schizophrenia]*. Zhurnal nevrologii i psikiatrii imeni S.S. Korsakova, 104 (1), SS. 47-51.
181. Vostrikov, V., Orlovskaya, D. und Uranova, N. (2008). *Deficit of pericapillary oligodendrocytes in the prefrontal cortex in schizophrenia*. The World Journal of Biological Psychiatry, 9 (1), SS. 34-42, DOI: 10.1080/15622970701210247.
182. Vostrikov, V. M., Uranova, N. A. und Orlovskaya, D. D. (2007). *Deficit of perineuronal oligodendrocytes in the prefrontal cortex in schizophrenia and mood disorders*. Schizophrenia Research, 94 (1-3), SS. 273-280, DOI: 10.1016/j.schres.2007.04.014.
183. Collins, C. E., Young, N. A., Flaherty, D. K., Airey, D. C. und Kaas, J. H. (2010). *A rapid and reliable method of counting neurons and other cells in brain tissue: a comparison of flow cytometry and manual counting methods*. Frontiers in Neuroanatomy, 4, DOI: 10.3389/neuro.05.005.2010.
184. Miller, D. J., Balam, P., Young, N. A. und Kaas, J. H. (2014). *Three counting methods agree on cell and neuron number in chimpanzee primary visual cortex*. Frontiers in Neuroanatomy, 8, SS. 36, DOI: 10.3389/fnana.2014.00036.
185. Young, N. A., Flaherty, D. K., Airey, D. C., Varlan, P., Aworunse, F., Kaas, J. H. und Collins, C. E. (2012). *Use of flow cytometry for high-throughput cell population estimates in brain tissue*. Frontiers in Neuroanatomy, 6, SS. 27, DOI: 10.3389/fnana.2012.00027.

-
186. Tian, D., Sun, S. und Lee, J. T. (2010). *The long noncoding RNA, Jpx, is a molecular switch for X chromosome inactivation*. Cell, 143 (3), SS. 390-403, DOI: 10.1016/j.cell.2010.09.049.
187. Vincent, J. B., Petek, E., Thevarkunnel, S., Kolozsvari, D., Cheung, J., Patel, M. und Scherer, S. W. (2002). *The RAY1/ST7 tumor-suppressor locus on chromosome 7q31 represents a complex multi-transcript system*. Genomics, 80 (3), SS. 283-294.
188. Aggernaes, B. (2017). *Autism: A transdiagnostic, dimensional, construct of reasoning?* European Journal of Neuroscience, DOI: 10.1111/ejn.13599.
189. Tong, Y. S., Zhou, X. L., Wang, X. W., Wu, Q. Q., Yang, T. X., Lv, J., . . . Cao, X. F. (2014). *Association of decreased expression of long non-coding RNA LOC285194 with chemoradiotherapy resistance and poor prognosis in esophageal squamous cell carcinoma*. Journal of Translational Medicine, 12, SS. 233, DOI: 10.1186/s12967-014-0233-y.
190. Nakagawa, S. (2016). *Lessons from reverse-genetic studies of lncRNAs*. Biochimica et Biophysica Acta, 1859 (1), SS. 177-183, DOI: 10.1016/j.bbagr.2015.06.011.
191. Qureshi, I. A., Mattick, J. S. und Mehler, M. F. (2010). *Long non-coding RNAs in nervous system function and disease*. Brain Research, 1338, SS. 20-35, DOI: 10.1016/j.brainres.2010.03.110.
192. Abarrategui, I. und Krangel, M. S. (2006). *Regulation of T cell receptor-alpha gene recombination by transcription*. Nature Immunology, 7 (10), SS. 1109-1115, DOI: 10.1038/ni1379.
193. Kuhlmann, T., Miron, V., Cui, Q., Wegner, C., Antel, J. und Bruck, W. (2008). *Differentiation block of oligodendroglial progenitor cells as a*
-

- cause for remyelination failure in chronic multiple sclerosis*. Brain, 131 (7), SS. 1749-1758, DOI: 10.1093/brain/awn096.
194. Stevens, J. R. (1988). *Schizophrenia and multiple sclerosis*. Schizophrenia Bulletin, 14 (2), SS. 231-241.
195. Andreassen, O. A., Harbo, H. F., Wang, Y., Thompson, W. K., Schork, A. J., Mattingsdal, M., . . . Dale, A. M. (2015). *Genetic pleiotropy between multiple sclerosis and schizophrenia but not bipolar disorder: differential involvement of immune-related gene loci*. Molecular Psychiatry, 20 (2), SS. 207-214, DOI: 10.1038/mp.2013.195.
196. Roberts, T. C., Morris, K. V. und Wood, M. J. (2014). *The role of long non-coding RNAs in neurodevelopment, brain function and neurological disease*. Philosophical Transactions of the Royal Society of London, 369 (1652), DOI: 10.1098/rstb.2013.0507.
197. Yao, J., Wang, X. Q., Li, Y. J., Shan, K., Yang, H., Wang, Y. N., . . . Yan, B. (2016). *Long non-coding RNA MALAT1 regulates retinal neurodegeneration through CREB signaling*. EMBO Molecular Medicine, 8 (9), SS. 1113, DOI: 10.15252/emmm.201606749.
198. Yoshimoto, R., Mayeda, A., Yoshida, M. und Nakagawa, S. (2016). *MALAT1 long non-coding RNA in cancer*. Biochimica et Biophysica Acta, 1859 (1), SS. 192-199, DOI: 10.1016/j.bbagr.2015.09.012.
199. Pollard, K. S., Salama, S. R., Lambert, N., Lambot, M. A., Coppens, S., Pedersen, J. S., . . . Haussler, D. (2006). *An RNA gene expressed during cortical development evolved rapidly in humans*. Nature, 443 (7108), SS. 167-172, DOI: 10.1038/nature05113.
200. Ishii, K., Kubo, K. I. und Nakajima, K. (2016). *Reelin and Neuropsychiatric Disorders*. Frontiers in Cellular Neuroscience, 10 (229), DOI: 10.3389/fncel.2016.00229.

-
201. Tolosa, A., Sanjuan, J., Leal, C., Costas, J., Molto, M. D. und De Frutos, R. (2008). *Rapid evolving RNA gene HAR1A and schizophrenia*. Schizophrenia Research, 99 (1-3), SS. 370-372, DOI: 10.1016/j.schres.2007.10.011.
202. Johnson, R., Richter, N., Jauch, R., Gaughwin, P. M., Zuccato, C., Cattaneo, E. und Stanton, L. W. (2010). *Human accelerated region 1 noncoding RNA is repressed by REST in Huntington's disease*. Physiological Genomics, 41 (3), SS. 269-274, DOI: 10.1152/physiolgenomics.00019.2010.
203. Wevrick, R., Kerns, J. A. und Francke, U. (1994). *Identification of a novel paternally expressed gene in the Prader-Willi syndrome region*. Human Molecular Genetics, 3 (10), SS. 1877-1882.
204. Murrell, A. (2014). *Cross-talk between imprinted loci in Prader-Willi syndrome*. Nature Genetics, 46 (6), SS. 528-530, DOI: 10.1038/ng.2994.
205. Stelzer, Y., Sagi, I., Yanuka, O., Eiges, R. und Benvenisty, N. (2014). *The noncoding RNA IPW regulates the imprinted DLK1-DIO3 locus in an induced pluripotent stem cell model of Prader-Willi syndrome*. Nature Genetics, 46 (6), SS. 551-557, DOI: 10.1038/ng.2968.
206. Higashimoto, K., Soejima, H., Saito, T., Okumura, K. und Mukai, T. (2006). *Imprinting disruption of the CDKN1C/KCNQ1OT1 domain: the molecular mechanisms causing Beckwith-Wiedemann syndrome and cancer*. Cytogenetic and Genome Research, 113 (1-4), SS. 306-312, DOI: 10.1159/000090846.
207. Chang, L., Yuan, Y., Li, C., Guo, T., Qi, H., Xiao, Y., . . . Liu, Q. (2016). *Upregulation of SNHG6 regulates ZEB1 expression by competitively binding miR-101-3p and interacting with UPF1 in hepatocellular carcinoma*. Cancer Letters, 383 (2), SS. 183-194, DOI: 10.1016/j.canlet.2016.09.034.
-

208. Hu, X., Hicks, C. W., He, W., Wong, P., Macklin, W. B., Trapp, B. D. und Yan, R. (2006). *Bace1 modulates myelination in the central and peripheral nervous system*. Nature Neuroscience, 9 (12), SS. 1520-1525, DOI: 10.1038/nm1797.
209. Faghihi, M. A., Modarresi, F., Khalil, A. M., Wood, D. E., Sahagan, B. G., Morgan, T. E., . . . Wahlestedt, C. (2008). *Expression of a noncoding RNA is elevated in Alzheimer's disease and drives rapid feed-forward regulation of beta-secretase*. Nature Medicine, 14 (7), SS. 723-730, DOI: 10.1038/nm1784.
210. Askari, B. S. und Krajcinovic, M. (2010). *Dihydrofolate reductase gene variations in susceptibility to disease and treatment outcomes*. Current Genomics, 11 (8), SS. 578-583, DOI: 10.2174/138920210793360925.
211. Chubb, J. E., Bradshaw, N. J., Soares, D. C., Porteous, D. J. und Millar, J. K. (2008). *The DISC locus in psychiatric illness*. Molecular Psychiatry, 13 (1), SS. 36-64, DOI: 10.1038/sj.mp.4002106.
212. Schumacher, J., Laje, G., Abou Jamra, R., Becker, T., Muhleisen, T. W., Vasilescu, C., . . . Cichon, S. (2009). *The DISC locus and schizophrenia: evidence from an association study in a central European sample and from a meta-analysis across different European populations*. Human Molecular Genetics, 18 (14), SS. 2719-2727, DOI: 10.1093/hmg/ddp204.

6 Danksagung

Besonderer Dank gilt:

Aus dem Zentrum für Neuropathologie und Prionforschung:

- **Professor Dr. Armin Giese** für die sehr gute Betreuung der Doktorarbeit nach dem Tod von Professor Dr. Kretzschmar
- **Dr. Otto Windl** für die sehr gute fachliche Hilfe und Unterstützung
- **Dr. Theo Kraus** für die Betreuung der Versuche
- **Dr. Thomas Arzberger** für die Bereitstellung einiger Gewebeproben
- **Janina Mielke** für die Hilfe und gute Unterstützung bei der Sanger-Sequenzierung
- Der gesamten **Arbeitsgruppe AG Windl**, vor allem **Virginie Guibourt**, **Ann-Kathrin Krauß**, **Julia Vlcek** und **Melanie Haider** für die Einweisung in das Labor und die Hilfe und Unterstützung

Außerdem:

- **Professor Dr. Falkai** und **Professor Dr. Andrea Schmitt** von der Klinik und Poliklinik für Psychiatrie und Psychotherapie der Kliniken München Innenstadt für die Betreuung des Projektes und für die Bereitstellung der psychiatrischen Proben
- **Professor Dr. Heinrich Leonhardt** für die Möglichkeit das Durchflussszytometer zu nutzen
- **Dr. Sebastian Bultmann** für die Hilfe bei der Einstellung des Durchflussszytometers